

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Seroprevalencia de brucelosis bovina en el distrito de  
Puerto Inca, Huánuco**

**TESIS**

para optar el título de Médico Veterinario

**AUTOR**

Alan Meza Cristóbal

**Lima-Perú**

**2008**

# Índice

INTRODUCCIÓN

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- ♦ Antecedentes
- ♦ Taxonomía y filogenia
- ♦ Características del agente
- ♦ Morfología y estructura
- ♦ Mecanismos inmunitarios
- ♦ Patogenia
- ♦ Epidemiología
- ♦ Métodos de diagnóstico
- ♦ Prevención y control

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIÓN

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

## I. INTRODUCCIÓN

En el Perú la producción pecuaria bovina (animales en pie) a nivel nacional es de 27 231t en promedio por mes durante el 2007. El 2006 se obtuvo 161 764 t (INEI, 2007). En los camales del departamento de Huánuco en noviembre del 2007 se han beneficiado 1293 animales (195. 03 toneladas métricas) registrados en los camales de Ambo, Huamalies, Dos de Mayo, Huanuco, Marañón, Pachitea, Leoncio Prado, Aucayacu y Puerto Inca (Huánuco Agrario, 2007). Estas cifras traducidas en costos nos hace ver que es importante la producción del ganado bovino en el departamento de Huánuco.

La brucelosis es una zoonosis de origen animal que, por sus características epidemiológicas y evolutivas, genera un importante impacto social y económico, ocasionando enormes pérdidas a la industria pecuaria y representando un verdadero riesgo ocupacional para las personas que trabajan con derivados pecuarios o que consumen productos crudos provenientes de animales infectados (Sbriglio *et al.*, 2007).

La enfermedad producida por la brucella se conoce también como fiebre del mediterráneo, fiebre recurrente, ondulante, fiebre del Río Grande y brucelosis, la cual se ha mantenido como una de las zoonosis de mayor distribución e importancia en el mundo, existiendo pocos países libres de la enfermedad.

El género *Brucella*, está formado por bacterias parásitas intracelulares facultativas, que producen el aborto epizoótico en muchos animales domésticos de animales y una enfermedad febril septicémica o infecciones focalizadas en el hombre. Dentro del género *Brucella* se distinguen actualmente siete especies y cada uno tiene un huésped natural: *Brucella abortus* que infecta a los bovinos; *Brucella melitensis* que infecta a los caprinos; *Brucella suis* que infecta a los porcinos; *Brucella canis* a los caninos, *Brucella ovis* a los ovinos, *Brucella neotomae* a roedores y la reciente aislada de lobos marinos y delfines *Brucella maris*. La especificidad de estas especies no es

absoluta, puesto que *Brucella abortus* puede infectar a los porcinos y caprinos cuando las mencionadas especies animales se crían juntas. Lo mismo ocurre con *Brucella suis* y *B. melitensis*; estas infecciones cruzadas tienen poca importancia dentro de la cadena epidemiológica ya que si desaparece el hospedero principal, en las otras especies no se transmite generalmente de un animal a otro; sin embargo, pueden complicar la erradicación de la enfermedad, por ello aquellos países que han controlado la brucelosis bovina se abocan inmediatamente al control de reservorios ya sean animales domésticos o salvajes (Samartino, 2003). *Brucella abortus* es uno de los principales agentes causantes de enfermedad en bovinos a nivel mundial. La infección usualmente causa aborto y eventualmente puede producir enfermedad en humanos causando fiebre ondulante entre otros síntomas (Sangari *et al.*, 1994)

El Perú cuenta desde 1998 con el Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina. En 1999 se efectuó el primer monitoreo para conocer la situación epidemiológica de brucelosis bovina en las principales cuencas lecheras del país; determinándose prevalencias de 0.07% al evaluar 33046 muestras de suero sanguíneo resultando 22 casos positivos. En 2000 la prevalencia fue de 0.06%, en 2001 fue de 0.01 % y en 2002 fue de 0.026%, siendo éste último un resultado obtenido a nivel nacional por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria. La prevalencia se ha reducido a niveles mínimos en las principales cuencas lecheras del país como Cajamarca, Arequipa, Lima y el Valle del Mantaro (SENASA, 2006).

La ganadería en el distrito de Puerto Inca, tiene como principal finalidad la producción de carne con *Bos indicus* y algunos cruces con *Bos taurus*. Estos son criados en forma extensiva con pastos mejorados, alcanzan la madurez sexual al año y medio de edad, y utilizan la monta natural como principal sistema de empadre. Se han tenido referencias sobre la introducción de animales mejorados de otras áreas aledañas sin ningún tipo de control, de donde se conoce la existencia de animales positivos a la prueba de Rosa de Bengala e historia de problemas reproductivos (datos no publicados). En tal sentido, el objetivo del presente trabajo es determinar la presencia de *Brucella sp.* en el ganado bovino de la provincia de Puerto Inca, Huánuco, mediante la detección de anticuerpos del suero de los bovinos a través de la prueba de Rosa de Bengala y usando como prueba confirmatoria (en caso de que salgan positivos) la de Fijación de Complemento.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ANTECEDENTES

La brucelosis es una zoonosis que presenta una elevada tendencia a producir infecciones crónicas tanto en el hombre como en los animales. El descubrimiento del agente etiológico de la enfermedad, conocida como Fiebre de Malta, se realizó a finales del siglo XIX, por un grupo de investigadores encabezados por David Bruce (López y Contreras, 2007). El curso de la brucelosis en la historia de la humanidad ha sido tratado por varios autores. Bräwer y Lehnent entre 1878 a 1880 determinaron el carácter infeccioso de los abortos en bovinos. Bruce en 1887, señaló que la Fiebre de Malta del hombre la producía una pequeña bacteria y cuando logró aislar por vez primera la bacteria la denominó *Micrococcus melitensis* (García *et al.*, 1988).

Bruce en 1887 descubrió el origen bacteriano de la fiebre de Malta (posteriormente denominada fiebre Mediterránea o fiebre ondulante) al estudiar el bazo de soldados británicos muertos como consecuencia de la enfermedad adquirida durante su estancia en la Isla de Malta. Los estudios microscópicos de los cortes de bazo de estos pacientes mostraron unas bacterias de pequeño tamaño que se teñían con azul de metileno y con el método de coloración de Gram, aparecían como gramnegativas. Además, consiguió su aislamiento después de inocular muestras de bazo procedente de estos pacientes en un agar enriquecido. Al cabo de 68 horas de incubación a 37°C aparecieron unas colonias pequeñas y redondeadas formadas por bacterias que morfológica y tintorialmente eran idénticas a las observadas previamente en los cortes de bazo de los pacientes fallecidos por Fiebre de Malta (Orduña *et al.*, 2002).

Bang y Stribolt en 1896, lograron comprobar que el aborto infeccioso en las vacas, lo causaba una bacteria que denominaron *Bacillus infectiosi*. En 1897 se produjo un importante avance en el diagnóstico serológico de la enfermedad una vez que Wright y

Smith refieren las aglutinaciones específicas en sueros sanguíneos de los enfermos. Zammit en 1905 informó que las cabras transmiten la enfermedad al hombre (surge el concepto de zoonosis) a partir del consumo de la leche infectada. Traum en 1914, puso al descubierto la etiología del aborto epizootico del cerdo. Evans en 1918, comprobó el íntimo parentesco entre el *Micrococcus melitensis* y el *Bacillus abortus*, estos resultados junto con los de Meyer y Shaw en 1920, permitió agrupar a estos microorganismos en un solo género bacteriano, denominado *Brucella*, y nombrándolos a cada uno como *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* (Benítez, 1979).

La susceptibilidad a la infección de la mayoría de los mamíferos domésticos y salvajes explica la prevalencia de la brucelosis en las principales áreas agrícolas del mundo (López y Contreras, 2007).

## 2.2 TAXONOMÍA Y FILOGENIA

El análisis del ácido nucleico de 16S del ribosoma (16S rRNA), la composición lipídica y ciertos aspectos de su fisiología y biología general sitúan a *Brucella sp.* dentro de la subdivisión -2 de la Clase Proteobacteria, en la que están también otros patógenos intracelulares (riquettsias), así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*), las propias mitocondrias y ciertas bacterias de la tierra. Por tanto, parece que la asociación intracelular con eucariotas es una tendencia evolutiva compartida con otros miembros de la subdivisión -2. Esto explica las reacciones cruzadas con otros miembros de esta subdivisión en pruebas serológicas y moleculares. Clásicamente, las brucelas se han agrupado en una serie de especies diferentes (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*) siguiendo, entre otros, el criterio de su huésped animal preferente. Además, dentro de algunas de estas especies se pueden distinguir biotipos o biovariedades siguiendo criterios como la sensibilidad a colorantes, tipo serológico y otros. Sin embargo, dentro de la subdivisión -2, las brucelas son un grupo muy homogéneo y se ha discutido si se deberían de incluir en una sola especie (*B. melitensis*), dando a las actuales la categoría de biovariedades (*B. melitensis* biovar *abortus*, biovar *suis*, biovar *neotomae*, etc.); o si, por el contrario, las especies clásicas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, etc...) deberían de prevalecer. Sea cual fuere el resultado de la controversia, la denominación clásica es práctica y es

aconsejable que el clínico y el bacteriólogo médico la mantengan para evitar confusiones (Moriyón *et al.*, 2001).

## **2.3 CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE**

*Brucella sp.* es una bacteria gramnegativa que es observada al microscopio como cocobacilos de 0,5 a 0,7 µm de diámetro y de 0,5 a 1,5 µm de largo. No produce cápsula ni esporas y tampoco posee movilidad. No toman la coloración bipolar, presentan un contenido de guanina más citosina (G-C) en el ADN de 56-58 %. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C en un pH de 6,6 a 7,4. Es aeróbica estricta teniendo un transporte de electrones basado en citocromos utilizando el oxígeno o el nitrato como aceptor final de electrones. Es catalasa positiva y a pesar de ser considerada un organismo complejo por sus requerimientos en el cultivo puede crecer en medios nutritivos mínimos. Se trata de un patógeno intracelular "facultativo" (Sbriglio *et al.*, 2007).

## **2.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA**

### **2.4.1 Envoltura Celular:**

Con el microscopio electrónico podemos observar de afuera hacia adentro: la envoltura celular esta integrada por la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana citoplasmática que rodea al citoplasma. Entre la membrana citoplásmica y la membrana externa se encuentra el espacio periplásmico y la capa de peptidoglucanos. La región apolar (hidrofóbica) de la membrana con un grosor de 4.5 nm, forma una barrera estructural y funcional entre el periplasma y el exterior de la célula. En el periplasma hay proteínas y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. El peptidoglucano se encuentra fuertemente asociado a la membrana externa a través de moléculas de lipoproteína unidas por ligadura covalente, ésto le proporciona una mayor estabilidad.

El citoplasma es rico en ADN, ARN, y proteínas citosólicas, algunas de ellas importantes desde el punto de vista del diagnóstico (Estein, 2006).

La membrana externa constituye la barrera física y funcional entre el interior de la célula bacteriana y su medio, además de ser la primera estructura que entra en

contacto con las células del sistema inmunológico del huésped durante los estadios tempranos de la enfermedad, ya que no se han descrito componentes capsulares en brucella. La supervivencia de la bacteria ya sea en el medio ambiente o en el huésped también depende de la integridad de su membrana externa ya que si ésta sufriera algún daño, la bacteria no sobreviviría por mucho tiempo. La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) (Moriyón *et al.*, 2002).

Los antígenos de la membrana externa de *Brucella sp.* han sido objeto de investigación desde el punto de vista del diagnóstico y de la inmunoprofilaxis; este interés es resaltado considerando que representa el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador (Robinson y Melling, 1993). Las moléculas mejor caracterizadas corresponden a dos grupos: LPS y proteínas de la membrana externa (OMPs: outer membrana proteins) (Estein, 2006).

De los constituyentes de la membrana externa el más estudiado ha sido el LPS por ser el mas externo, abundante y antigénico al cual se le conoce también como endotoxina. Sus propiedades bioquímicas y biológicas son diferentes a las del resto de bacterias gramnegativas, especialmente en cuanto al contenido de ácidos grasos del lípido A. La envoltura celular del genero *Brucella sp.* difiere de los gramnegativos por su membrana externa por dos razones: en primer lugar, es relativamente permeable a agentes hidrofóbicos como colorantes, detergentes y sales biliares. En segundo lugar, resistente a los péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (lisozima, lactoferrina, defensinas, etc.) y a otros policationes bactericidas como la polimixina B2. La envoltura de brucella contiene, entre otros fosfolípidos, fosfatidil-colina, lo que es poco común en patógenos gramnegativos, y lípidos de ornitina. Los fosfolípidos y el LPS poseen ácidos grasos de cadena más larga que lo habitual en los gramnegativos típicos. Es posible que estas características se relacionen con la tinción positiva de las brucellas por el método de Stamp (ácido-alcohol resistentes modificado) (Moriyón *et al.*, 2002).

#### **2.4.1.1 Lipopolisacárido (LPS)**

Las especies de brucella pueden ser clasificadas como “lisas” (S) o “rugosas” (R) de acuerdo al aspecto de las colonias en medio sólido. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de LPS expresado en mayor proporción en superficie: LPS-S o



LPS-R. El LPS-S consta de una parte glicolípida (lípid A), insertada en la membrana externa y otra polisacáridica expuesta hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo, más interno y la cadena O (polisacárido O: PSO). Esta cadena es un homopolímero lineal de perosamina que se encuentra ausente en el LPS-R de las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*) (Moreno *et al.*, 1984). La cadena O contiene los epítomos relevante en el diagnóstico serológico realizado con las pruebas que detectan anticuerpos frente al LPS-S (todas aquellas que emplean suspensiones celulares o extractos que contienen LPS-S).

El PSO es el antígeno inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de brucella (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la estructura antigénica más expuesta (Díaz y Léveux, 1972) y blanco de anticuerpos protectores (Plommet, 1987). Por otro lado, el PSO posee epitopes compartidos con otras especies bacterianas como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O:157 H7 responsables de reactividad cruzada en las pruebas serológicas que se basan en la detección de anticuerpos hacia este antígeno (Cherwonogrodzky *et al.*, 1990).

El LPS tiene probablemente una papel sustancial en la adherencia y supervivencia intracelular (Adams, 1997). Además es portador de los antígenos inmunodominantes de brucella, por lo que se considera responsable de la activación de los linfocitos B y de la inducción de la respuesta inmune humoral. En muchos casos es causante de los síntomas de choque séptico por la actividad endotóxica de la brucella. Las cepas de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y las brucellas marinas en fase lisa, poseen el LPS-S que está constituido de un lípido A, formado de diferentes ácidos grasos; una región central (núcleo) que contiene el ácido 2-ceto 3-desoxioctulosónico, glucosa, manosa y quinovosamina; y una cadena O, proyectada hacia el exterior de la membrana externa, constituida de un homopolímero de alrededor de 100 unidades de 4-formamido-4,6-didesoximanosa (perosamina).

Las cepas con epitopo A dominante (*B. abortus* bv. 1) contienen un polímero de cinco perosaminas unidas por ligadura  $\alpha$ -1,2y con una cierta proporción (dependiendo de la cepa) de unidades ligadas por unión  $\alpha$  -1,3; mientras que las cepas que son M dominante (*B. melitensis* bv. 1), presentan unidades repetidas de un pentasacárido constituido de una perosamina unida por ligadura  $\alpha$  -1,3 y cuatro unidas por ligadura  $\alpha$  -1,2. Las diferentes ligaduras influyen en la forma del epitopo del LPS, así el tipo A

dominante tiene forma de barra mientras que el tipo M dominante es retorcido (rizado). La presencia de moléculas de perosamina en el LPS de algunas bacterias gramnegativas, es responsable de la actividad antigénica cruzada que se observa con: *Escherichia hermanni* y *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae* O:1. *Yersinia enterocolitica* O:9; contiene una cadena O casi idéntica a la de *B. abortus* así como algún determinante M. Este hecho debe tomarse muy en cuenta al realizar el diagnóstico por métodos serológicos, ya que con frecuencia se cometen errores y no se llega a establecer un buen diagnóstico diferencial, se trate de animales o de humanos.

La estructura del LPS de cepas rugosas, es básicamente similar al LPS-S, excepto por la cadena O, que está ausente o reducida a unos pocos residuos. Por lo que, la especificidad del LPS-R estará determinada por el polisacárido del núcleo. La falta de cadena O modifica la superficie bacteriana de tal modo que las brucelas no forman suspensiones estables y autoaglutinan.

#### **2.4.1.2 Proteínas De Membrana Externa (OMPs)**

Las OMPs son de gran interés porque las han relacionado con la protección. Las que primero se describieron fueron las proteínas mayores de 25-27, de 31-34 y de 36-38 kDa. Las que, posteriormente, formaron los grupos 3 (25-27) y 2 (36-38) (Ficht *et al.*, 1990).

##### **2.4.1.2.1 OMPs Mayores:**

Las OMP mayores o principales, se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa, sin embargo, estarían menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico que causan las largas y abundantes cadenas O del LPS en las cepas lisas (Bowden *et al.*, 1995).

##### **2.4.1.2.2 OMPs menores**

Las Omps menores son Omp1 y las lipoproteínas Omp10, Omp16, Omp19 que, a diferencia de las mayores, no se encuentran asociadas al peptidoglucano (Cloeckaert

*et al.*, 1996). Entre otras proteínas minoritarias, se ha descrito una lipoproteína de 8 kDa unida en forma covalente al peptidoglucano que posee epitopes comunes con una lipoproteína de *E. coli* (Gómez-Miguel *et al.*, 1987).

Estas proteínas son de interés debido a su especificidad, por lo que no muestran reacción cruzada con otros gérmes, y por su potencial utilización en el campo de las vacunas y del diagnóstico serológico.

Los componentes superficiales de la bacteria son claramente críticos en la primera etapa de la interacción entre el huésped y el parásito. La fagocitosis de la bacteria, por parte de los fagocitos mononucleares, ocurre como consecuencia del alto grado de afinidad entre las invasinas del microorganismo y los receptores del huésped (Kaufmann, 1995). Una vez que la bacteria ha alcanzado el medio intracelular, desarrolla estrategias para su supervivencia; por ejemplo, la interferencia en la formación del fagolisosoma y modificación del tránsito intracelular (Doherty y Kaufmann, 1994).

## **2.5 Mecanismos Inmunitarios**

### **2.5.1 Rol del Sistema Inmunitario**

El sistema inmune juega un papel importante en la conservación de la salud. *Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del sistema reticuloendotelial y desencadena en el huésped susceptible una respuesta inmune innata y adaptativa. Las células del huésped se exponen principalmente a dos diferentes categorías estructurales de antígenos, el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas, los que ejercen diferentes formas de activación del sistema inmune. Las proteínas bacterianas antigénicas inducen una respuesta inmune específica tanto celular como humoral con células de memoria funcionales.

El sistema mononuclear fagocítico está compuesto por una población celular muy heterogénea, distribuida en todo el organismo e involucrada en numerosos eventos homeostáticos, inflamatorios e inmunológicos (Bullido *et al.*, 1997). Una vez que los microorganismos han penetrado en el interior del hospedador, uno de los primeros sistemas de defensa que se ponen en marcha es el sistema fagocítico. Éste juega un papel crucial en la defensa frente a las infecciones pues no sólo consigue en la mayoría

de las ocasiones la eliminación del patógeno, si no que constituye un eficaz mecanismo de retraso de la progresión de la infección, dando tiempo para que se activen los mecanismos inmunitarios específicos (Orduña *et al.*, 2002).

Los fagocitos mononucleares, integrantes del sistema mononuclear fagocítico, actúan en la defensa de los organismos multicelulares frente a patógenos microbianos. Pueden llevar a cabo una gran variedad de funciones, que incluyen fagocitosis, destrucción de agentes patógenos, células tumorales o células envejecidas, procesamiento o presentación de antígenos a linfocitos durante la fase de inducción de la respuesta inmune específica, producción de citocinas y citotoxicidad en la fase efectora de esta respuesta. Su interacción temprana con los patógenos determina el curso de la infección. Un conjunto complejo de condiciones microambientales, incluyendo citocinas y productos microbianos, controlan la función dinámica de estas células.

Las bacterias pueden resistir a la muerte intracelular, sobreviviendo y multiplicándose dentro de las células del sistema mononuclear fagocítico (Unanue, 1993). Los macrófagos son células fagocíticas, presentadoras de antígeno capaces de modular la respuesta inmune a través de la producción de diferentes citoquinas (Liautard *et al.*, 1996). La fagocitosis representa el proceso utilizado por los fagocitos mononucleares (FMN) y polimorfonucleares (PMN) para ingerir y eliminar las partículas mayores a 0.5  $\mu\text{m}$ , tales como los agentes infecciosos y células envejecidas (Kaufmann, 1999). Después de la penetración de un microorganismo en el interior de un organismo superior, se produce una gran extravasación y afluencia de leucocitos, principalmente PMN hacia el foco de infección en un proceso largo y complejo que incluye diferentes fases como la marginación de los leucocitos, la extravasación y la migración. La migración hacia el foco de infección es seguida por los leucocitos siguiendo gradientes de concentración (quimiotaxis) de diversas sustancias microbianas y mediadores celulares que se originan en el foco de infección. Una vez que los fagocitos se ponen en contacto con los microorganismos se produce la adherencia de éstos, lo que conlleva generalmente la estimulación de diferentes receptores de la superficie de las células (receptores para los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas, receptores para el complemento, receptores para polisacáridos, etc.), y por tanto la activación de varias de las funciones de los fagocitos. Se produce la ingestión o englobamiento del microorganismo en un fagosoma sobre el que se vierte el contenido

de los lisosomas presentes en los fagocitos (desgranulación y formación del fagolisosoma) (Orduña *et al.*, 2002).

El tipo de fagocitosis, la naturaleza del receptor utilizado y la activación de esta célula son variables críticas para determinar el desenlace de la infección. Así, se ha demostrado que cepas rugosas y lisas de *B. abortus* son rápidamente ingeridas sólo si son opsonizadas con complemento o anticuerpos específicos. En macrófagos bovinos, derivados de glándula mamaria, las cepas virulentas de *Brucella abortus* presentan una mayor tasa de sobrevivencia y replicación, comparadas con cepas rugosas o no virulentas (Harmon *et al.*, 1989).

Una vez que la bacteria ha alcanzado el medio intracelular, desarrolla estrategias para su supervivencia; como la interferencia en la formación del fagolisosoma y modificación del tránsito intracelular (Doherty y Kaufmann, 1994).

### **2.5.2 Formación del fagolisosoma**

Luego de la internalización en la célula huésped, las partículas inertes como bolas de látex o levaduras fijadas se localizan en un compartimento limitado por una membrana, conocido como el fagosoma naciente. Inicialmente las membranas de los fagosomas nacientes presentan una composición proteica similar a la de la membrana plasmática de la cual se originan, pero rápidamente comienzan a reciclar los componentes de las mismas y a adquirir marcadores de endosomas tempranos como Rab5 y EEA1, lo que les permite fusionarse con las organelas endocíticas. Comienza entonces un proceso de fusión secuencial caracterizado por la adquisición de marcadores de endosomas tardíos y lisosomas como las glicoproteínas de membrana LAMP, la H-ATPasa, el receptor de manosa-6-fosfato (MPR), el complejo mayor de histocompatibilidad MHC-II y varias hidrolasas de la familia de la catepsina (Duclos y Desjardins, 2000). Todos estos cambios contribuyen a la formación del fagolisosoma, un compartimento ácido e hidrolítico que permite degradar y procesar a los microorganismos para presentar luego los antígenos en la superficie celular.

Simultáneamente a la formación del fagolisosoma se activan un conjunto de mecanismos capaces de producir la muerte de los microorganismos acantonados en los fagolisosomas. Por una parte, se activan los sistemas bactericidas O<sub>2</sub>-independientes contenidos en los lisosomas como las proteínas catiónicas, la lactoferrina y una gran variedad de enzimas. Por otra parte, se activan los sistemas bactericidas O<sub>2</sub>-

dependientes, los cuales constituyen el principal mecanismo bactericida de las células fagocíticas (Orduña *et al*, 2002).

### **2.5.3 Producción de radicales oxígeno y combustión oxidativa**

Los mecanismos efectores de los FMN incluyen: generación de radicales de oxígenos (ROI), producción de radicales de nitrógeno (RNI), limitación de la disponibilidad de hierro, acidificación del fagosoma, fusión del fagolisosoma y producción de citocinas (Adams, 1997). En los FMN, los mecanismos de muerte dependientes del oxígeno juegan un papel importante en los procesos antibacterianos, estudios preliminares sobre el efecto de brucella en la combustión oxidativa indican que la ingestión no induce la producción de ROI. Estos experimentos fueron realizados con bacterias sin opsonizar. Por el contrario, las brucelas expuestas a antisuero son capaces de inducir la liberación de cantidades significativas de O<sub>2</sub>. La NADPH oxidasa, activada por IFN- $\gamma$  y por la unión IgG/FcR, inicia la producción de ROI. Esta reacción es también dependiente de Fe. Los monolitos sanguíneos, pero no los macrófagos tisulares, poseen mieloperoxidasa (MPO), que permite la halogenación de las proteínas microbianas (Cooray, 1996).

El sistema MPO de los FMN, que es uno de los sistemas bactericidas oxígeno-dependiente encontrado en los mamíferos, es estimulado por la invasión de microorganismos. La estimulación induce a un aumento de la reducción de oxígeno y liberación de radicales superóxido dentro del fagolisosoma. Los nucleótidos cíclicos producidos por *Brucella sp.* inhiben la desgranulación de los neutrófilos y la liberación de la enzima MPO, necesaria para producir reactivos haluros (Cooray, 1996).

Como ya se mencionó los FMN poseen sobre su superficie una plétora de moléculas que actúan como receptores específicos de superficie de varios ligandos. Las brucelas han desarrollado diversas estrategias para infectar a los FMN a través de algunos receptores, y no ser destruidos por sus mecanismos bactericidas, una de las estrategias desarrolladas consiste en la unión a moléculas de superficie celular, como los miembros de la familia de los receptores de integrinas (Pearson, 1996).

## 2.6 PATOGENIA

La mayoría de los animales se infectan con brucella directamente a través de la mucosa oronasal, por ingestión de alimentos contaminados o por inhalación de polvo de los establos con microorganismos que los animales han secretado, con la leche o los exudados vaginales después del aborto (Rodríguez *et al.*, 2001). Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las bacterias son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en el interior de las células fagocíticas (Ilarmon *et al.*, 1988). Los ganglios linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses (Rodríguez *et al.*, 2001). En los fagosomas de los macrófagos, *Brucella* sobrevive y se multiplica, inhibiendo la fusión del fagosoma que contiene la bacteria y el lisosoma, mediante la acidificación rápida del medio (Celli *et al.*, 2003; Ko y Splitter., 2003). En células fagocíticas no profesionales, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa y la activación de una serie de pequeñas GTPasas (Guzmán- Berri *et al.*, 2001), tendiendo a localizarse dentro del retículo endoplásmico rugoso (Corbel, 1997).

En infecciones experimentales en ratones, se ha observado que la infección tiene dos fases: durante las primeras dos semanas la bacteria se multiplica rápidamente. En la segunda fase, el número de bacterias se estabiliza hacia la quinta o sexta semana y luego decrece lentamente hasta desaparecer (Hong *et al.*, 2000). La especial afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal de bovinos hace que estas bacterias también proliferen extensamente en trofoblastos de la placenta que rodean al feto (Meador y Deyoe, 1989), lo que condiciona que la principal manifestación clínica de la infección aguda en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación, o el nacimiento de animales prematuros poco viables (Ficht, 2003). Los daños en el útero producen placentitis necrosante y endometritis ulcerativa grave, caracterizada por una infiltración leucocitaria marcada, con linfocitos y células plasmáticas, congestión y proliferación celular que conduce a una necrosis, sumados a la endotoxemia que causa la coagulación intravascular a este nivel, interfiriendo el balance de nutrientes de la madre al feto (Kennedy y Miller, 1993).

Al establecerse la bacteria en la placenta, ocasiona diversos cuadros patológicos, que dependen de la virulencia de la cepa involucrada. Si es de baja virulencia sólo causará una ligera inflamación de la placenta, seguido de la retención de placenta. Si la bacteria tiene una virulencia intermedia, la inflamación de la placenta puede ser moderada, con focos de placentitis severa que irán extendiéndose lentamente. Este avance progresivo interfiere en el funcionamiento normal de la placenta, causando estrés en el feto, sin llegar a matarlo, como resultado de este estrés la hipófisis fetal libera ACTH (hormona Adrenocorticotrópica) la cual inicia la cascada de eventos que conducen al parto, como consecuencia se produce el aborto de un feto de muerte reciente. Si la bacteria es de virulencia alta, puede matar al feto muy rápidamente debido a la endotoxemia que induce la síntesis de PG F2 $\alpha$ , causando coagulación intravascular o interfiriendo la circulación sanguínea a nivel de la placenta, ya sea por los daños causados a la placenta o el feto mismo (hipoxia o acidosis en el feto, que estimula su respiración, produciendo inhalación de líquido amniótico, resultando en una neumonía fetal), sin dar tiempo a ser expulsado en el parto pudiendo comportarse como feto macerado, expulsándose varios días post mortem (Kennedy y Miller, 1993).

La predilección especial de la bacteria por el útero gestante y la placenta se atribuye a la presencia del i-eritritol que se ha demostrado que estimula el crecimiento de la *Brucella* tanto *in vivo* como *in vitro*; el i-eritritol es utilizado principalmente por *Brucella abortus* como fuente de energía (Corbel, 1991). En los fetos infectados se desarrolla hiperplasia linfoide de múltiples ganglios linfáticos y múltiples focos inflamatorios diseminados, probablemente la neumonía fetal se debe a la localización de focos perivasculares en los septos interlobulares del pulmón, lo que es un indicio de la diseminación hematógena de la bacteria en el feto (Pérez *et al.*, 1998). En bovinos machos provoca alteraciones testiculares y una disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo (Hausler y Koontz, 1974).

En humanos la infección se produce a través del contacto con secreciones de animales infectados o consumo de leche cruda o queso contaminado. El consumo de carne no es una fuente de contaminación (Mandell *et al.*, 1995). *Brucella* puede ingresar al organismo a través de lesiones de la piel, mientras se manipulan animales infectados o sus desechos (Mandell *et al.*, 1995; Sauret y Vilissova, 2002). En países en que la infección por *Brucella* es endémica en la población animal, la infección por *Brucella* en



humanos es frecuente (Roop *et al.*, 1994, Yagupsky, 1999), sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual (Fiori *et al.*, 2000). La enfermedad puede ser adquirida por exposición ocupacional de los trabajadores de mataderos, carniceros y veterinarios, al inhalar aerosoles contaminados o en viajes a lugares donde la infección es endémica (Yagupsky, 1999). Las infecciones asociadas al trabajo de laboratorio representan el 2% de los casos y se ha informado que el período de incubación de la brucelosis adquirida por accidente en el laboratorio puede variar entre seis semanas a cinco meses (Fiori *et al.*, 2000).

## **2.7 EPIDEMIOLOGÍA**

### **2.7.1 Especies susceptibles a la Enfermedad**

Son muy diversas las especies susceptibles a la enfermedad, entre ellas se describen los animales domésticos como los bovinos, porcinos, equinos, caprinos, ovinos, caninos (esporádicamente); el búfalo, yak, camello, dromedario y alpaca; animales silvestres como ratas del desierto y otros móridos, liebre, caribú, zorro, hurón, antílope, bisonte americano, visón y mamíferos marinos (Flores, 1980; García *et al.*, 1988; Bofill *et al.*, 1996; NWF, 2001). Brucelosis afecta principalmente al ganado bovino productor de leche criado en forma estabulada, debido al continuo contacto entre animales a que están sometidos éstos (SENASA, 2002).

### **2.7.2 Reservorios naturales**

La supervivencia de los agentes etiológicos de la enfermedad en la naturaleza, está dado, por la existencia de reservorios naturales, de los cuales se citan los bovinos, porcinos, caprinos y ovinos, de *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*, respectivamente. El hospedador natural de *B. canis*, es el perro y el de *B. ovis* es el ovino (Bofill *et al.*, 1996).

### **2.7.3 Distribución**

En el mundo la infección animal por *Brucella abortus* sigue siendo la más frecuente a pesar del uso de vacunación masiva. Las zonas de mayor prevalencia animal corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, y algunas partes de África y América Latina, principalmente en México, Brasil y Colombia (ENCOLOMBIA, 2003).

En el centro y norte de Europa y en Australia la infección por *B. abortus* ha sido prácticamente erradicada. En Norteamérica, la brucelosis es especialmente prevalente en las zonas agrícolas del norte y centro de México (Gándara *et al.*, 2001), mientras que en Canadá y Estados Unidos ha disminuido considerablemente en los últimos años. *Brucella abortus* está presente en todos los países de América Central, con un rango de prevalencia de 4 a 8% (Moreno *et al.*, 2002).

El biovar 1 es universal y el predominante de los siete que ocurren en el mundo. La distribución de los diferentes biovars presenta variaciones geográficas. En América latina se han comprobado los biovars 1, 2, 3, 4 y 6 y más de 80% de las cepas correspondían al biovar 1 (Acha y Szyfres, 1992).

En Sudamérica, Uruguay es el que tiene la menor prevalencia, presentándose casos esporádicos. Argentina comenzó un programa de control de la enfermedad, al igual que algunos estados de Brasil (Lopetegui P. 2005). En Chile, la Décima Región de Los Lagos es la que comprende la mayor área productora de leche y, además, tiene la mayor concentración de ganado infectado (Rivera *et al.*, 2002).

La brucelosis bovina está muy difundida en el país, especialmente en las cuencas lecheras de Arequipa, Trujillo, Cajamarca y Lima, en donde el sistema de explotación es estabulado o semiestabulado. Los últimos reportes realizados por el SENASA en el año 2000 denotan una prevalencia de 0.06% en los departamentos de Lima, Arequipa y Cajamarca (SENASA, 2006).

#### **2.7.4 Fuente de infección**

La fuente primaria de infección está representada por las hembras grávidas que, al abortar o parir, expulsan grandes cantidades de brucellas con el feto, el líquido amniótico y las membranas fetales. También pueden difundir la enfermedad las hembras poco después de abortar eliminando brucellas con la secreción vaginal y las vacas aparentemente sanas que segregan leche que contiene brucellas. En menor grado pueden contribuir a la contaminación del campo las materias fecales de terneros que se alimentan de leche contaminada, ya que no todas las brucellas se destruyen en el tracto digestivo. Los toros libres de infección no la contraen por cubrir a vacas infectadas, pero si son positivos, pueden infectar a éstas, aunque muy raras veces.

En las demás especies el proceso es similar. Las fuentes secundarias más importantes desde el punto de vista práctico lo constituyen las membranas fetales, el líquido amniótico y el feto infectado, pues contienen cantidades enormes de brucella y pueden infectar fuertemente la cama y el suelo de los establos, el pienso y hasta en algunas circunstancias de mala higiene y cuidado, el agua de bebida (Carter, 1985). La eliminación de brucella en la leche se da durante semanas, meses y años; y la contaminación es posible sobre todo en aquellas salas de ordeño donde la higiene es muy deficiente y que al ordeñar, se dejan caer al piso los primeros chorros de leche (despunte). Algunos planteamientos hechos sugieren también la eliminación de la brucella por la orina (Mederos *et al.*, 1981).

### **2.7.5 Transmisión**

La brucelosis se transmite al hombre a partir del animal infectado, quien constituye el auténtico reservorio de la enfermedad. El germen puede penetrar en el organismo por múltiples vías.

#### **2.7.5.1 Ingestión:**

La vía de penetración más importante es el tracto gastrointestinal por ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas. Las vacas tienen además la costumbre de lamer membranas fetales, fetos y terneros recién nacidos, que contienen todos ellos gran número de brucella y constituyen una fuente de infección muy importante. El instinto de las vacas de lamer los órganos genitales de otras vacas contribuye también a la transmisión de la infección (Moreno *et al.*, 2002).

Existen pruebas de una transmisión horizontal de la infección de perro a perro, bovino a perro, perro a bovino y perro a persona (Palmer *et al.*, 1997), donde se define la forma más eficaz de transmisión horizontal bovino a perro es por exposición a fetos abortados, o a membranas placentarias infectadas, ya que los perros suelen ingerir los restos del parto.

En el hombre la infección puede producirse a través del tubo gastrointestinal, pero es mucho más frecuente su paso por la orofaringe ya que el pH ácido del estómago puede destruir la brucella, excepto en los casos de inóculo masivo (Young, 1994; Rodríguez *et al.*, 1998). Los pacientes que utilizan antiácidos, pueden desarrollar

brucelosis rápidamente cuando se exponen a la infección, debido a la ausencia del efecto bactericida de los jugos gástricos.

La ingestión de leche cruda, no pasteurizada infectada y sus derivados en zonas endémicas es uno de los más comunes modos de transmisión de la enfermedad. Los casos que se producen en el medio urbano reconocen en general este origen. El queso fresco, no curado, de procedencia casera y en consecuencia no sometido a control sanitario, es el principal vehículo de esta forma de contagio. (Vazquez *et al.*, 1994; Talamante *et al.*, 1991; Palacios *et al.*, 1998).

En los quesos fermentados, la acidificación destruye los gérmenes. La carne no suele ser vehículo de transmisión ya que temperaturas de 70°C durante 10 minutos, destruyen a las brucellas, que por otra parte se encuentran en baja concentración en el tejido muscular (Sadler, 1960). Otros productos animales como hígado, carne o sangre son raramente transmisores de la enfermedad, debido a que no son consumidos crudos habitualmente, no obstante han sido ocasionalmente implicados en la transmisión de la enfermedad (Syrjamaki *et al.*, 1984; Chan *et al.*, 1989). Se han descrito brotes hídricos (agua contaminada por aguas residuales de mataderos) o por alimentos vegetales de consumo crudo, pero no son comunes.

#### **2.7.5.2 Inoculación:**

La autoinoculación accidental de vacuna de brucella viva, puede suceder durante el proceso de vacunación de animales. Igualmente, la adquisición de la enfermedad puede ser el resultado de un accidente biológico que implique pinchazo en personal sanitario de laboratorios.

#### **2.7.5.3 Contacto:**

Se pueden producir infecciones mediante las camas infectadas, en lesiones de las tetillas, en los extremos de los miembros o en el espacio interdigital que faciliten la penetración del agente patógeno en capas profundas de la piel. Al ordeñar, quizás puedan introducir brucella en la piel de los pezones las manos humedecidas con leche infectada.

En el hombre el contacto con animales infectados o sus productos es probablemente el mecanismo principal de transmisión de la enfermedad. Las brucellas penetran a través de la piel sana o macerada y de las mucosas nasal y conjuntiva. Este mecanismo es el más frecuente en el medio rural y en relación con actividades agrícolas

y ganaderas, pudiendo llegar a ser el responsable del 60-70% de todos los casos registrados. Pastores, veterinarios, matarifes, manipuladores de carnes, pieles y otros productos de animales infectados constituyen la población a riesgo de este mecanismo de transmisión.

La salpicadura accidental de vacuna de brucella viva en los ojos durante la vacunación de animales es una vía de entrada conocida entre los veterinarios con el consiguiente desarrollo de brucelosis oftálmica y sistémica.

#### **2.7.5.4 Inhalación:**

La vía inhalatoria ocurre habitualmente como un riesgo profesional entre pastores, trabajadores de mataderos (Luna *et al.*, 1998), carniceros, trabajadores de plantas de procesamiento de carne, veterinarios y trabajadores de la lana. En la limpieza de establos se producen auténticos aerosoles cargados de brucelas que pueden infectar por inhalación. Por otra parte, la inhalación de aerosoles es la vía más frecuente de infección entre los trabajadores de laboratorios (Martín *et al.*, 1994).

La dosis infectante de brucella en aerosoles es de tan sólo 10-100 microorganismos; de hecho, es uno de los microorganismos investigados como potencial arma biológica (Franz *et al.*, 1997).

#### **2.7.5.5 Transmisión de persona a persona:**

La transmisión de la enfermedad de persona a persona ha suscitado grandes polémicas en los últimos años. La transmisión madre a hijo durante el parto (Poole y Whitehouse, 1972; Schereyer *et al.*, 1980; Singer *et al.*, 1991) a través de la leche materna, o la transmisión por vía sexual parecen estar razonablemente documentadas, aunque, de cualquier forma, la trascendencia de estas posibles vías de transmisión en la perpetuación de la enfermedad es anecdótica (Rubben *et al.*, 1991; Peña y Gutierrez, 1993). Se han comunicado casos de brucelosis transmitidos por transfusiones de sangre de donantes en fase de bacteriemia pero asintomáticos o en trasplantes de médula ósea (Economidou *et al.*, 1976; Naparstek *et al.*, 1982).

#### **2.7.5.6 Infección Congénita:**

La infección se puede producir en terneros nacidos de vacas, se produce en útero y puede permanecer latente en el ternero durante los primeros meses de vida. Los

terneros nacidos de madres positivas son serológicamente positivos hasta los 4 – 6 meses de edad debido a los anticuerpos recibidos en el calostro (Radostits *et al.*, 2001).

#### **2.7.5.7 Brucelosis Adquirida En Laboratorios:**

La brucelosis es la infección bacteriana adquirida en el laboratorio notificada con más frecuencia. El personal con mayor riesgo es el de laboratorios de investigación donde se manipulan cultivos de brucella en cantidades importantes, pero también se han declarado casos en laboratorios clínicos por contacto cutáneo con cultivos o con especímenes clínicos infecciosos de animales como sangre o flujo uterino, por aerosoles, por pipetear con la boca, por inoculaciones accidentales, y por salpicaduras en los ojos, la nariz o la boca. Los factores que parecen influir sobre el resultado de un accidente biológico con preparados vacunales incluyen: ruta de exposición, dosis de vacuna inoculada, y estado inmunológico previo de la víctima (Young, 1995). La aerosolización de la vacuna en los ojos, conlleva un mayor riesgo de infección que los pinchazos con agujas, quizá teniendo en cuenta el volumen de vacuna inoculado. Si el sujeto tiene anti- cuerpos preexistentes frente a brucella en el momento del accidente, el resultado es generalmente una reacción local, autolimitada a veces acompañada de síntomas generales, como fiebre y escalofríos. Esto se cree es debido a una respuesta alérgica, aunque la naturaleza de la reacción permanece aún sin identificar. En ausencia de anticuerpos preexistentes, existe riesgo de desarrollar brucelosis aguda, aunque dicho riesgo parece ser pequeño. Recientemente, se han descrito brotes de brucelosis entre trabajadores de laboratorios, en los que se ha identificado la inhalación de aerosoles contaminados como mecanismo de transmisión (Montes, 1986; Olle y Canela, 1987; Martín *et al.*, 1994).

#### **2.7.6 Difusión y permanencia de la enfermedad en el rebaño:**

La brucelosis al introducirse en un rebaño se disemina rápidamente, pudiendo alcanzar proporciones de epizootias. Si no son introducidos nuevos animales, pierde su severidad inicial pasando a una forma enzoótica, en la cual sino son aplicadas medidas severas permanece por varios años (Wilson y Miles, 1975).

La brucelosis tiene como característica epizootiológica que al introducirse en un rebaño nuevos animales se rompe el equilibrio y pueden aparecer no solamente

animales seropositivos, sino también con la forma clínica de la enfermedad (Fernández, 1982).

## **2.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Además de las observaciones clínicas realizadas por los veterinarios, el diagnóstico de la brucelosis animal puede basarse en pruebas de laboratorio directas, mediante el aislamiento bacteriológico, o indirectas, mediante la demostración de una respuesta serológica o celular específicas; sin embargo, debido a la posibilidad de reacciones cruzadas con otras bacterias, la presencia de anticuerpos o la existencia de una respuesta celular en un determinado animal no significan necesariamente que éste sufra una infección activa por *Brucella*. Por ello, los resultados del diagnóstico indirecto deben siempre interpretarse a la luz de los datos clínicos y bacteriológicos.

### **2.8.1 Diagnóstico Bacteriológico**

La brucelosis animal puede diagnosticarse presuntivamente mediante el examen microscópico de frotis de secreciones vaginales, placenta, feto abortado o semen, coloreados por los procedimientos de Gram, Köster o Stamp (Blasco, 2001). Una persona experimentada puede realizar este diagnóstico presuntivo con garantía, debiendo confirmarlo siempre mediante el aislamiento bacteriológico en un medio de cultivo, que es la prueba de diagnóstico más específica. *Brucella* puede ser aislada a partir de contenido estomacal fetal, pulmones, hígado, bazo, cerebro, trozos de cotiledones, secreciones vaginales, calostro, leche, semen, tejido mamario y ganglios linfáticos supramamarios, iliacos y retrofaringeos (Kirkbride, 1990).

La utilización de muestras correctas y la disponibilidad de medios selectivos adecuados permiten realizar el diagnóstico bacteriológico preciso en la mayor parte de los casos. La muestra más recomendable es la secreción tomada directamente de la vagina de los animales abortados. Además, la leche es una muestra recomendable ya que más del 80% de los animales infectados excretan *Brucella* por la leche.

El cultivo en agar sangre en una atmósfera conteniendo un 10% de CO<sub>2</sub> (salvo para el caso de *B. canis* que no requiere de CO<sub>2</sub>) es el más simple y utilizado de los procedimientos bacteriológicos (Jawetz *et al.*, 1999). Sin embargo, en veterinaria se hace indispensable la utilización de medios selectivos, ya que las muestras proceden de lugares normalmente hospedados por una rica flora comensal (vagina, leche, fetos

abortados, etc.). Para el aislamiento de *B. abortus* se han reportado óptimos resultados con el uso de medio selectivo de Farrell, que contiene una serie de antibióticos a los que dicha especie es resistente. A diferencia de un gran porcentaje de cepas de *B. melitensis* no desarrollan debido a la presencia en este medio de una alta concentración de bacitracina. Por ello, para el aislamiento de *B. melitensis* se recomienda usar, además del medio de Farrell, el medio semiselectivo de Thayer-Martin modificado, que permite aumentar la sensibilidad del cultivo. Las colonias de brucella en aislamiento primario no suelen ser visibles hasta los 3-5 días de incubación. Ante un crecimiento característico sobre un medio selectivo, una tinción de Gram (cocobacilos gramnegativos) y las pruebas de oxidasa y ureasa son suficientes para garantizar un diagnóstico certero de brucelosis.

Es preciso tener en cuenta que estas bacterias tienen la capacidad para transmitirse a la especie humana. Por lo tanto, todos los trabajos de manipulación de muestras, siembras, etc., deben realizarse adoptando las medidas de bioseguridad (Blasco, 2001).

## **2.8.2 Diagnóstico Serológico**

### **2.8.2.1 Prueba Rosa de Bengala**

La prueba de Rosa de Bengala es una técnica de aglutinación en lámina portaobjeto para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos anti-Brucela en suero humano o animal. La suspensión bacteriana y coloreada, es aglutinada por anticuerpos IgG o IgM presentes en el suero del animal, por lo tanto reconoce IgG<sub>1</sub> y en menor nivel IgM; formándose la reacción antígeno – anticuerpo (Fernandez y Barrientos, 2004). Su positividad persiste por mucho tiempo, con la ventaja que puede realizarse en suero sin diluir, además de presentar escasísimos fenómenos de prozona, por lo que su negatividad descarta prácticamente la enfermedad brucelar (Casas, 1976), siendo altamente sensible también en animales vacunados por lo que las muestras positivas deben ser confirmadas con otros métodos. El resultado positivo en nuestro país es de reporte obligatorio ante el SENASA. (Fernandez y Barrientos, 2004).

La prueba de Rosa de Bengala está internacionalmente estandarizada para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina y es recomendada por el Comité Mixto FAO/OMS de expertos de brucelosis y la OIE (OIE, 2004). En nuestro país, la prueba



tamiz oficial en la ejecución de las actividades del programa nacional de control y erradicación de brucelosis bovina, es la prueba de rosa de bengala (RB) según DS-033-2000-AG del Ministerio de Agricultura de nuestro País.

La prueba de Rosa de Bengala se basa en la inactivación de las IgM, generalmente las inespecíficas por el efecto del bajo pH del antígeno (Samartino, 2003). Cuando el antígeno se mezcla con el suero o plasma la variación del pH es muy limitada elevándose de 3.65 – 3.85 ( $\pm 0.05$ ). Se estableció que esta prueba tiene una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100% (Nielsen *et al.*, 2002)

### **2.8.2.2 Fijación de Complemento**

Una propiedad importante del sistema del complemento es que sus componentes son enzimáticamente alterados durante la reacción, de modo que no reaccionarán en una nueva secuencia de reacciones, es decir si el complemento es consumido durante las reacciones antígeno-anticuerpo; ocurre cuando un anticuerpo de tipo IgG o IgM reacciona con el antígeno en presencia de complemento, aún cuando éste no sea requerido en la reacción.

La prueba se lleva a cabo en dos fases. En la fase primera se mezclan el suero del paciente (previamente calentado a 56°C) y el antígeno en presencia de una cantidad determinada de complemento; esta mezcla es generalmente incubada durante 30 minutos a 37°C. Si se forman los complejos antígeno-anticuerpo, el complemento es fijado. En la segunda fase se adiciona el sistema indicador que consiste en glóbulos rojos de carnero y anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero. La ocurrencia de hemólisis indica que el complemento no fue utilizado por lo tanto, en la fase 1 no se ha producido una reacción Ag-Ac específica. En cambio, la ausencia de hemólisis, indica que el complemento ha sido fijado y por lo tanto que en la fase 1 se ha producido una reacción Ag-Ac, en este caso se considera una reacción de fijación del complemento positiva, mientras que en el primer caso se considera negativa la reacción de fijación de complemento (Pedrique y De Castro, 2003). Es una prueba laboriosa y complicada pero confiable por su alta especificidad superiores al 99%, sin embargo se invierte mucho tiempo en su estandarización y requiere de personal calificado.

En nuestro país el SENASA la utiliza como prueba confirmatoria. Detecta casi exclusivamente anticuerpos IgG<sub>1</sub>, las IgG<sub>2</sub> no fijan el complemento mientras que las

IgM si fijan el complemento, pero se inactivan al calentar los sueros. Es una prueba muy específica (99.9%) y bastante sensible (97.5%) (Nielsen, 2002).

### **2.8.2.3 Prueba del anillo en leche**

Esta técnica permite hacer el diagnóstico de brucelosis en estanques de leche. Al igual que las técnicas en suero, el objetivo es el diagnóstico de anticuerpos específicos. La técnica consiste en poner la leche de la cual se busca la presencia de anticuerpos, en contacto con antígeno específico teñido, el cual a través de un proceso de incubación, se unirá al anticuerpo presente en la muestra de leche. De esta forma migran a la superficie grasa de la muestra y se puede así observar la formación de un anillo coloreado.

La ventaja de esta técnica es que con un bajo costo, nos permite la pesquisa de un animal positivo dentro de un grupo de animales negativos, sin hacer un análisis individual. Podemos por esto considerarla como una técnica sensible. La desventaja es la especificidad, debido a que existe la posibilidad de obtener falsos positivos; estos resultados responden a una serie de causas, entre las cuales podemos encontrar: existencia de muchas vacas dentro del estanque prontas al secado, con mastitis o vacas calostrales (Fernandez y Barrientos, 2004).

### **2.8.2.4 ELISA indirecta**

En esta técnica se cubren con una capa de solución de antígeno pequeños pozos preformados en placas de poliestireno, los antígenos proteínicos se unen con firmeza a ese material, de modo que el antígeno no unido pueda después extraerse aplicándole un lavado enérgico; esto permite que los pozos de la placa permanezcan revestidos del antígeno. El suero es colocado dentro de los tubos, de manera que los anticuerpos específicos del suero puedan unirse al antígeno que se encuentra fijo a las paredes de los tubos. Después de la incubación y del lavado para extraer el anticuerpo no unido, la presencia de los anticuerpos que se unieron se puede detectar agregando una antiglobulina (inmunoabsorbente) ligada químicamente a una enzima, este complejo se une a los anticuerpos, detecta y mide con solo agregar el sustrato para la enzima correspondiente. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de antiglobulina ligada a la enzima que se haya captado, la cual a su vez, será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero (Tizard, 1998).

Esta técnica tiene una alta sensibilidad y a diferencia del Ring Test también posee una alta especificidad, la cual la convierte en una técnica de apoyo para hatos en proceso de saneamiento (Fernandez y Barrientos, 2004).

#### **2.8.2.5 ELISA Competitivo**

Es una prueba Inmunoenzimática que ayuda a diferenciar anticuerpos vacunales de los producidos por la infección de campo, utilizando como antígeno SPL-S proveniente de la *B. abortus* (Nielsen, 2002). El principio de esta técnica consiste en hacer participar un anticuerpo extra que compite en su unión al antígeno en la base de la placa de Elisa con los anticuerpos producidos por el animal infectado. Luego participa un tercer anticuerpo conjugado, éste está unido a una enzima la cual es la responsable de dar color al ponerla en contacto con el sustrato específico para ésta. Este último anticuerpo está elaborado para unirse solo al anticuerpo extra y no al anticuerpo generado por el animal. Si fuese el caso de una muestra positiva, el anticuerpo extra al competir con los anticuerpos generados naturalmente por el animal como respuesta a la infección por *Brucella abortus*, no es capaz de unirse al antígeno; por lo que la unión al anticuerpo conjugado no se produce, no hay acción de la enzima sobre el sustrato y por tanto no hay generación de color. Las ventajas de esta técnica, es que nos permite la pesquisa de pequeñas cantidades de anticuerpos, lo que se traduce en un diagnóstico más temprano de la enfermedad. Además posee una alta sensibilidad y a diferencia de la prueba de Rosa de Bengala, también presenta una alta especificidad (Fernandez y Barrientos, 2004).

#### **2.8.2.6 Prueba con 2-mercaptoetanol**

La prueba del 2-ME es colectiva y se basa en el hecho de que los anticuerpos IgM se degradan debido a la acción de ciertos compuestos que contienen el radical tiol, tales como el 2 Mercaptoetanol, la cisteína y el dithioeritrol sin producir efectos sobre los anticuerpos IgG (Mc Mahon, 1983).

#### **2.8.2.7 Prueba de Rivanol**

Esta prueba consta de dos fases: la primera consiste en la precipitación de las proteínas, con excepción de las IgG, utilizando una solución de Rivanol, por lo tanto el Rivanol sirve para separar las IgG de las IgM detectando así el mismo tipo de anticuerpo que el 2-ME y la segunda estriba en una aglutinación rápida empleando

antígeno de aglutinación en placas, especial para esta prueba, ajustando el pH de 3.8 - 6.2 y con una concentración celular del 4%. Esta menor concentración celular determina una mayor sensibilidad que compensa la dilución al 50% del suero, ocasionada por la previa adición del Rivanol (Anderson, 1964), las globulinas del sobrenadante están en relación con la cantidad de Rivanol añadido y con la especie animal de que procede el suero tratado (Casas, 1976).

La principal limitación de la prueba es que solamente se puede realizar en laboratorios que posean el antígeno especial para su ejecución siendo factible que los laboratorios adopten métodos para efectuarla con antígeno de prueba lenta (Alton *et al.*, 1976).

## **2.9 PREVENCIÓN Y CONTROL**

En la mayoría de las situaciones epidemiológicas, los rumiantes domésticos son las principales especies afectadas y las que intervienen mayoritariamente en el ciclo epidemiológico humano. Al no existir ningún procedimiento totalmente efectivo para prevenir este contagio humano, la única posibilidad de evitarlo pasa obligatoriamente por la erradicación de la enfermedad en los rumiantes (Blasco *et al.*, 1994). Hasta ahora, el único procedimiento conocido para lograrlo consiste en la detección de los animales infectados mediante pruebas de diagnóstico adecuadas y su inmediata eliminación por sacrificio. Sin embargo, la aplicación de este programa no siempre es posible, bien porque la prevalencia en las especies afectadas es demasiado elevada, las condiciones socioeconómicas de los países afectados no lo permiten, o bien por ambos aspectos a la vez, que suele ser lo más frecuente.

Existe una cierta tendencia a considerar que los programas de control de tipo diagnóstico y sacrificio, aplicados con éxito para la erradicación de la brucelosis bovina en los países del norte de Europa son perfectamente válidos también en todas situaciones epidemiológicas y socioeconómicas. Mientras que en zonas con una prevalencia baja y un elevado nivel socioeconómico, la vacunación debería estar incluso desaconsejada, el uso de vacunas resulta imprescindible en regiones con elevada prevalencia, independientemente de su situación socioeconómica. Por lo tanto, la aplicación de un programa de profilaxis vacunal en los rumiantes es imprescindible para controlar la difusión de la enfermedad en la mayoría de situaciones. Sin embargo, estos programas de vacunación, por muy eficientemente que se ejecuten, nunca pueden por sí

solos lograr la erradicación de la brucelosis. En consecuencia, para conseguir la erradicación de la enfermedad será preciso aplicar un programa de profilaxis vacunal, combinado con un programa de detección de los animales infectados y su sacrificio inmediato. La complementación de ambos programas ha sido y continúa siendo uno de los principales problemas en el control colectivo de la brucelosis, pero no el único.

Como requisito imprescindible para abordar con garantía cualquier programa de control de la brucelosis bovina, ovina y caprina en una determinada región, su administración debería disponer de medios financieros, materiales y humanos en cantidad y calidad suficiente. Además, cualquier programa que se ejecute debe ser diseñado con continuidad en el tiempo, ya que una campaña de control debe monitorearse teniendo presentes plazos mínimos de 10 a 20 años para obtener resultados. Por otra parte, como requisito previo antes de iniciar cualquier tipo de control, la situación epidemiológica real debería conocerse perfectamente mediante una investigación epidemiológica sobre una muestra representativa en las diferentes especies animales afectadas. Finalmente, las condiciones de explotación y los hábitos de manejo deben conocerse con precisión para poder ser controlados, en particular los movimientos de ganado, factor capital para el éxito de cualquier programa de erradicación de la enfermedad. En aquellas regiones en los que la prevalencia sea elevada, los sistemas de producción extensivos y los recursos financieros limitados, la puesta en marcha de un programa de vacunación sobre la totalidad de los efectivos es la única estrategia de actuación posible para detener el avance de la infección y mantenerla a unos niveles de prevalencia razonables.

La vacunación sistemática, indiscriminada y repetida en el tiempo de todos los animales de la zona de actuación con una vacuna adecuada, conduce a una disminución notable de la prevalencia al cabo de los años. Este es el único programa de control eficaz para ser aplicado durante muchos años en rumiantes en regiones con elevada prevalencia (más del 20% de los rebaños infectados), baja tecnificación del ganadero y escasez de recursos técnicos y financieros en la administración. En la actualidad las vacunas disponibles para el control de la brucelosis son *B. abortus* cepa 19 y *B. abortus* RB 51, empleados para la vacunación de bovinos y ungulados silvestres; donde el empleo de la cepa 19, se realiza en terneras de entre 3 y 12 meses. Según los programas de cada país, esta cepa otorga una protección de aproximadamente el 70 % de acuerdo a distintos autores, pero tiene el inconveniente de inducir títulos serológicos que son indistinguibles de los producidos por cepas del campo. La cepa vacunal RB51 es de tipo

rugoso atenuado que carece de cadena O del LPS, la ausencia de esta cadena permite vacunar una o varias veces sin inducir anticuerpos que reaccionen en las pruebas clásicas empleadas para el diagnóstico de *Brucella sp* (Samartino *et al.*, 2000). La vacunación de toros maduros y vaquillonas preñadas con cepa RB51, no produce colonización en ganglios ni órganos sexuales, por lo que puede utilizarse esta vacuna para controlar la enfermedad en áreas de alta prevalencia vacunando toda la población bovina (Edmonds *et al.*, 1999).

En la gran mayoría de los países en vías de desarrollo ésta es la única estrategia posible para disminuir la prevalencia con el tiempo hasta alcanzar niveles compatibles con la instauración de un programa de erradicación definitiva. La única base de este programa es la vacunación con una vacuna de buena calidad, realizada en la totalidad de los animales presentes, y aplicada con la continuidad necesaria en el tiempo para garantizar el nivel inmunitario de la población. Por otra parte, la utilización de programas de vacunación compatibles con la erradicación es la estrategia más económica y eficiente para el control de la brucelosis en aquellas regiones con prevalencias moderadas y capaces de poner en marcha un sistema de identificación individual y de control de los movimientos pecuarios. Este programa se basa en la vacunación de los animales de reposición (entre los 3 y 6 meses de edad) con una vacuna adecuada y en el diagnóstico serológico ulterior, realizado repetidamente en animales mayores de 14-18 meses, y procediendo al sacrificio de los seropositivos. Este programa combinado podría recomendarse en regiones con prevalencia moderada (por ejemplo cuando menos del 10% de los rebaños están infectados) y con condiciones epidemiológicas, técnicas y financieras muy favorables.

El Perú cuenta desde 1998 con un programa nacional de control y erradicación de brucelosis bovina basado en métodos serológicos convencionales, tales como la prueba de anillo de leche empleada para mantener la vigilancia epidemiológica en áreas libres, la prueba de rosa de bengala utilizada como prueba de campo o tamiz y la prueba de fijación del complemento y/o ELISA empleadas como pruebas confirmatorias y el sacrificio de los animales reactores positivos a las pruebas diagnósticas. La vacunación se establece como medida obligatoria de control en los fundos con alta prevalencia (MINAG, 2000; SENASA, 2006).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 LUGAR DEL ESTUDIO**

El muestreo se realizó en la Provincia de Puerto Inca, Región de Huánuco durante octubre, noviembre y diciembre del 2007. Las muestras fueron recolectadas al azar de los diferentes caserios de los distritos de Puerto Inca. Siendo los caserios muestreados por el Sur: Chavín, 3 de Mayo, La Florida y Villa Fuerte; por el Centro: Playa Alta, Puerto Inca, Yanayacu y Nueva Trujillo; y por el Norte: Santa Teresa, C. N. Cleyton, Buena Vista, San Antonio, Paraíso y Puerto Sira.

#### **3.2 MATERIALES**

##### **3.2.1 Animales**

Los animales seleccionados para este estudio fueron 3221 bovinos, mayores de tres meses de edad, en su mayoría cruces (criollos), de un total de 81 ganaderos de la provincia; estos animales son criados en forma extensiva. La reproducción es principalmente por monta natural.

##### **3.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO**

Suero bovino, el cual es utilizado para detectar anticuerpos contra la bacteria; antígeno de Rosa de Bengala, cepa 1119-3, con una concentración celular de 8%, un pH de 3.65, para cepas lisas de *Brucella sp.* (Instituto Nacional de Salud, Perú).

##### **3.2.3 MATERIAL Y EQUIPOS**

Materiales y equipos como centrífuga, termas, congeladora y refrigeradora; materiales de laboratorio como: micropipetas (30ul), tubos de ensayo, agujas no 18g x 1 ½, viales estériles, tips para micropipetas, placa de aglutinación, homogenizadores, alcohol y

algodón; y materiales de campo como: cinta maskin tape, plumón indeleble, libreta de muestreo, lápiz marcador de ganado, fichas de muestreo, fichas diagnosticas.

### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1 Tamaño muestral

Para determinar el tamaño muestral se utilizó la fórmula para estimar proporción de una población infinita (Ahlbom y Norrell, 1990).

$$n = \frac{Z^2 \alpha \cdot p \cdot q}{d^2}$$

Donde:

$Z^2 \alpha =$	(para un nivel de confianza del 99%)	2.56
$p =$	proporción esperada	0.01
$q =$	$1-p$	0.99
$d =$	precisión	0.005

$$n = 2627 \text{ animales}$$

Al momento del muestreo se logró obtener 3221 muestras y se trabajó con todas ellas.

#### 3.3.2 Colección de Muestras

Las muestras se obtuvieron por punción de la vena coccígea, identificándose cada tubo con el número asignado a cada animal, la edad, el sexo, junto a todo esto se llevaba un registro con datos de procedencia, propietario y la fecha de colección; luego de extraer las muestras se refrigeraron en las termas hasta el momento del transporte al laboratorio de Zoonosis del Ministerio de Salud Micro Red Puerto Inca.

En el Laboratorio del MINSA se centrifugaron las muestras a 3500 rpm por 5 minutos, luego de extraer el suero fueron identificados y conservados en la congeladora hasta el momento de la realización de la prueba.



### **3.3.3 Prueba de rosa de Bengala**

Se empleó esta prueba de acuerdo al decreto supremo N° 033-2000-AG (Diario Oficial el Peruano, 2000) la cual señala en el capítulo V, artículo 10, que la Rosa de Bengala es la prueba diagnóstica de campo para brucelosis bovina; se aplicó según el Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas de la Organización Internacional de Epizootias (OIE, 2004).

Procedimiento:

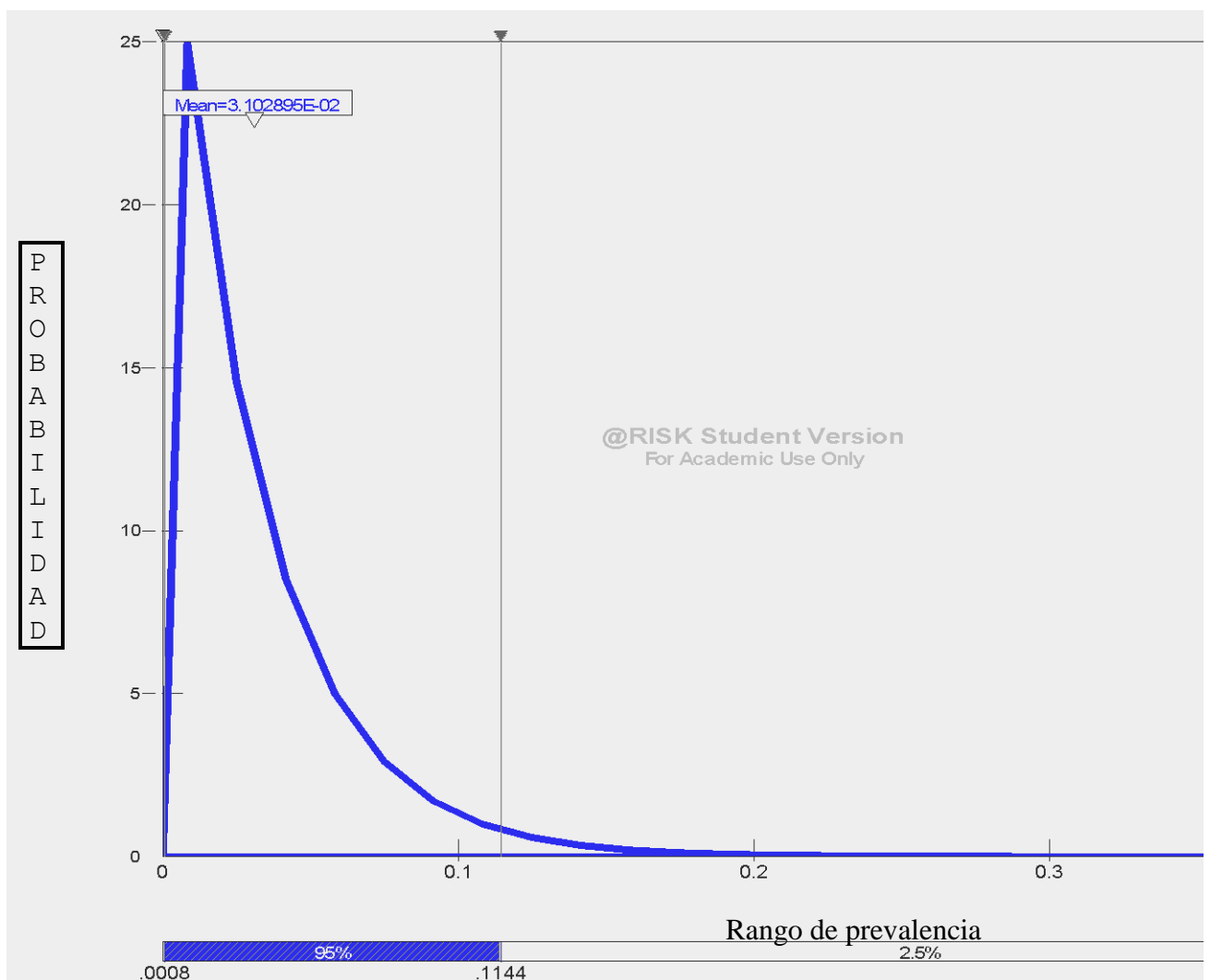
1. Se colocó 30 ul del suero, con una micropipeta, sobre uno de los cuadrantes de la placa de vidrio del aglutinoscopio.
2. Luego se colocó 30 ul de Rosa de Bengala-antígeno de *Brucella abortus*– cepa 1119-3.
3. Se procedió a mezclar el suero y el antígeno con los homogenizadores hasta homogenizarlos durante el tiempo de 4 minutos formando una gota de alrededor de 2 centímetros de diámetro.

La lectura se realizó a los 4 minutos, una reacción positiva presentaría grumos producto de la aglutinación (arenilla). En las reacciones negativas no se observará ninguna aglutinación.

#### **IV. RESULTADOS**

Del total de 3221 muestras procesadas no se encontraron anticuerpos contra brucella en ninguna de las muestras colectadas de bovinos provenientes de la Provincia de Puerto Inca, Departamento de Huánuco, mediante la prueba de rosa de Bengala. Para el análisis de estas muestras se les agrupó en 3 zonas: centro, norte y Sur ( cuadro 1); sexo (cuadro 3) y edad (cuadro 2).

Los valores recolectados ingresaron al programa de simulación @Risk, el cual calculó una prevalencia media de 0.031%; con una distribución de la prevalencia entre 0.0008 % y 0.1144% (Gráfico. 1). Prevalencia obtenida a partir de la correspondiente distribución probalística desarrollada en el gráfico de simulación beta.



**Gráfico 1. Distribución de la probabilidad de la prevalencia de brucelosis bovina para la totalidad de las muestras en las 3 zonas de la provincia de Puerto Inca, Huánuco, con intervalos del 95% de confianza.**

**Cuadro 1.** Distribución de las muestras según la procedencia (Puerto Inca, Huánuco).

Zonas	Muestras Obtenidas	Positivos a Rosa de Bangala
Norte	888	0
Centro	1059	0
Sur	1247	0
Total	3221	0

Al distribuir las muestras por edades se consideró agruparlos en 3 categorías (cuadro 2) estos mismos datos fueron agrupados por sexo (cuadro 3).

**Cuadro 2.** Distribución de muestras según grupo etáreo (Puerto Inca, Huánuco)

Grupo etáreo	Muestras obtenidas	Positivo a Rosa de Bengala
4-8 meses	347	0
9-14 meses	337	0
May. 14 meses	2537	0
total	3221	0

**Cuadro 3.** Distribución de las muestras según el sexo (Puerto Inca, Huánuco)

Sexo	Muestras obtenidas	Positivo a Rosa de Bengala
Hembra	2799	0
Macho	422	0
Total	3221	0

## V. DISCUSIÓN

El Perú cuenta desde 1998 con el Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina, en 1999 se efectuó el primer monitoreo para conocer la situación epidemiológica de brucelosis bovina en las principales cuencas lecheras del Perú; determinándose prevalencias muy bajas como sigue: de 0.07% al evaluar 33046 muestras de suero sanguíneo resultando 22 casos positivos; en 2000 fue de 0.06%, en 2001 fue de 0.01 % y en 2002 fue de 0.026% siendo éste último un resultado obtenido a nivel nacional por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (Informe IAEA/FAO, 1999).

La prevalencia encontrada en el presente estudio es similar a la encontrada en Obenteni, donde el valor de su prevalencia está ausente o por debajo del 1% (Zapata,1998) y en Pucallpa donde Cordero y Huanca (1999) hallaron un valor de prevalencia de 0.53%; sin embargo, en otra área del trópico con alto potencial ganadero como Tambopata-Madre de Dios, Cárdenas (2000) encontró un valor de 5.4%. Estos valores resultan de los porcentajes de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica utilizada, del número de animales muestreados y de la situación epidemiológica de la zona en el momento del estudio. Es así que tanto Zapata (1998) como Cárdenas (2000) utilizaron la prueba de ELISA con valor de sensibilidad de 96.35% y de especificidad 96.44%, mientras que Cordero y Huanca (1999) utilizaron la prueba de rosa de bengala con valor de sensibilidad y de especificidad no descrito. En cuanto al número de animales muestreados, Zapata (1998) muestreó en Gran Pajonal (centro poblado menor de Obenteni) teniendo como tamaño muestral 408 bovinos, Cordero y Huanca (1999) muestrearon en 16 fundos de Pucallpa obteniendo un tamaño muestral de 568 y Cárdenas (2000) muestreó en 31 fundos de cuatro distritos de los

sectores este y oeste de la provincia de Tambopata. Con respecto a la situación epidemiológica de la zona, sólo Cárdenas (2000) tuvo como antecedente la presencia de un brote de brucelosis bovina en la zona de estudio. Finalmente, la información sobre la prevalencia de brucelosis en la región selvática (región más extensa del territorio nacional) es escasa; entre los diversos planes de desarrollo, siempre se ha considerado el fomento de la ganadería bovina, por lo que debería ser basado en un manejo adecuado, sin afectar el delicado equilibrio con el medio ambiente.

La brucelosis animal puede generar barreras en la comercialización de los animales y sus productos, lo cual podría alterar seriamente el desarrollo socioeconómico, especialmente de los pequeños ganaderos, el sector más vulnerable en muchas poblaciones rurales. Por esta razón, la OMS y otros organismos han establecido planes para eliminar la Brucelosis de ovinos, caprinos y bovinos tanto en Europa como en América Latina.

No se dispone de datos de seroprevalencia bovina en zonas como Puerto Inca, es así que el objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia de la *Brucella* sp. en bovinos de crianza extensiva de la provincia de Puerto Inca.

La provincia de Puerto Inca se encuentra delimitada por el Norte y Este con la Región Ucayali; por el Sur con la Ciudad Constitución, Región Pasco; por el Oeste con la Región Pasco.

La prueba Rosa de Bengala utilizada en este estudio es la prueba tamiz para la detección de brucelosis en el país recomendada en lugares donde no se realiza vacunación como es el caso de nuestro estudio y presenta una especificidad de 100% y una sensibilidad de 75% (Corbel, 1991), es una prueba sencilla de aglutinación que emplea un antígeno brucélico coloreado con Rosa de Bengala. Es recomendada como una prueba de complementación con otras, como la prueba de placa. Esta prueba reconoce la IgG<sub>1</sub> en mayor cantidad y la IgM en menor cantidad, empleándose como una prueba de preselección en el diagnóstico individual de bovinos, es altamente sensible especialmente en animales vacunados, por lo que las muestras positivas deben ser confirmadas por otros métodos. (FAO/OMS, 1986; Tizard, 1998); la desventaja de la prueba así como las pruebas estándares, es la incapacidad de discriminar anticuerpos de origen vacunal de aquellos originados por una infección; en el presente estudio este aspecto no tuvo importancia, debido a que en la provincia de Puerto Inca no se emplea

la inmunización contra brucelosis, por lo que la presencia e anticuerpos se relacionarían con infección por brucella de campo.

La baja prevalencia de brucelosis en estos animales es ventajoso frente a otras áreas ganaderas donde la brucelosis está presente y constituye una permanente amenaza para la salud animal y la salud pública. La ausencia de reactores a *Brucella* sp. en los animales muestreados se debe a que esta enfermedad tiene una prevalencia muy baja, a la ubicación geográfica del distrito de Puerto Inca donde el tránsito de animales con otros distritos es muy bajo, por lo cual no se logró obtener ningún reactor positivo. Con respecto a las vías terrestres de comunicación en el distrito de Puerto Inca las carreteras hacia dicho distrito están muy dañadas por las constantes lluvias, esto hace que no sea fácil el acceso de animales de otros distritos cercanos a Puerto Inca.

La información proporcionada por los ganaderos no evidenció la existencia de problemas reproductivos como los abortos o retenciones de placenta, que son los signos clínicos más importantes de la brucelosis, muchos ganaderos no comercializan; constituyendo un argumento más que apoya la ausencia de la infección en los animales muestreados. Viéndose en la necesidad de utilizar para el presente estudio simulaciones de distribución beta para calcular los datos de seroprevalencia con sus respectivos intervalos de confianza.

## **VI. CONCLUSION**

La prueba de Rosa de Bengala no determinó ningún reactor positivo a anticuerpos contra brucelosis bovina; que según el programa de simulaciones estocástica de distribución beta indica un valor de la prevalencia promedio de 0.031% con una distribución de la prevalencia entre 0.0008 y 0.1144% para la brucelosis bovina en el distrito de Puerto Inca.



## **VII. RECOMENDACIONES**

- Instaurar el programa de control y erradicación, buscando la condición de libre de la enfermedad luego de las evaluaciones que norman en la ley correspondiente.
- Controlar el tránsito de animales (reproductores), con las medidas de control efectivas como: cuarentena, vigilancia epidemiológica, métodos de diagnóstico específicos.
- Brindar la adecuada educación sanitaria a los ganaderos por parte del organismo oficial de sanidad (SENASA), por su importancia económica, sanitaria y epidemiológica para el Perú.

## LITERATURA CITADA

1. **Acha P, Szyfres B.** 1992. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS. Washington, EEUU. 3a ed. p 646-657.
2. **Adams G.** 1997. Brucellosis: an overview. 1st internacional Conference on Emerging Zoonoses. Emerging Infect Dis;3: 1-12.
3. **Ahlbom, A.;** Norrel, S. 1990. Introduction to modern epydemiology. 2da. Ed. USA: Epidemiology resources. P: 9-23, 25-27.
4. **Alton G, Jones ML, Pietz DE.** 1976. Las técnicas de laboratorio en brucelosis. 2a. Ed. Ginebra, Suiza.
5. **Anderson RK.** 1964. Precipitación por Rivanol. Prueba de Aglutinación en Placa. Dir. of Vet. and public. Helth. College of Veterinary Medicine. University of Minnesota. U.S.A.
6. **Benitez A.** 1979. Brucelosis Bovina. Boletín de reseñas. Serie Veterinaria. Ministerio de la Agricultura. CIDA. IMV. La Habana, Cuba. 1-59.
7. **Blasco J, Nicoletti P, Verger J, Moriyón I, Lopez I, Diaz R, Plommet M.** 1994. Brucelosis bovina. Bovis 57: 59-77.
8. **Blasco J.** 2001. Brucelosis animal: la enfermedad y medidas para su control y erradicación. En: Manual de brucelosis. Junta de Castilla y León. España. Pag. 31-43.
9. **Bofill P, Rivas A, Ramírez W.** 1996. Brucelosis. En: Manual de Enfermedades Infecciosas. Primera reimpresión. Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones del Instituto Politécnico Nacional, México. 2:60- 84.
10. **Bowden RA, Cloeckert A, Zygmunt MS, Dubray G.** 1995. Outer membrana protein and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. J. Med. Microbiol. 43, 344-347.
11. **Bullido R, Gomez de Moral M, Alonso F, Ezquerra A, Zapata A, Sanchez C.** 1997. Monoclonal antibodies specific for porcine monocytes / macrophages:

- macrophage heterogeneity in the pig evidenced by the expresión of surface antigens. *Tissue antigens*; 48:1-11.
12. **Cárdenas, J.** 2000. Seroprevalencia de *B. abortus* en bovinos de la provincia de Tambopata-Madre de Dios. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima. 28 p
  13. **Carter G.** 1985. Brucelosis. En: *Bacteriología y Micología Veterinarias* (aspectos generales). Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. 230- 238.
  14. **Casas R.** 1976. Diagnóstico serológico de la brucelosis. *Zoonosis*. 18(3/4):107-130.
  15. **Celli J, Chastellier Ch, Franchini D, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel J.** 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 198, 545-556.
  16. **Chan J, Baxter C, Wenman Wm.** 1989. Brucelosis in a In uit child probably related to caribou meta consumption. *Scan J Infect Dis*; 21: 337 -8.
  17. **Cherwonogrodzky JW, Dubray G, Moreno E, Mayer H.** 1990. Antigens of *Brucella*, pp 19-64. In: Nielsen K. y Duncan J.R. Eds. *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton.
  18. **Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Vizcaíno N.** 1996. Minireview: Molecular and immunological characterization of the major outer membrana proteins of *Brucella*. *Fems Microbiol. Lett.* 145, 1-8.
  19. **Corbel M.J.** 1991. Brucelosis. En: *Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria*. Laing, J.A., Brinley Morgan, W.J., Wagner, W.C. (eds). 4<sup>ta</sup> ed. p 201-236. Ed. Interamericana. España.
  20. **Corbel M.J.** 1997. *Brucellosis: an overview*. *Emerg Infect Dis* 3, 213-221.
  21. **Cordero, H. y Huanca, W.** 1999. Incidencia de *Brucella abortus* en ganado bovino cruzado en la zona de Pucallpa. *Anales científicos UNALM*. 128-134 p
  22. **Cooray R.** 1996. Casein effects on Myeloperoxidase-mediated oxygen-dependent bactericidal activity of bovine neutrophils. *Vet immunol Immunopathol*; 51:55-65.
  23. **Decreto supremo N° 033-2000-AG.** 2000. Diario Oficial El Peruano. Aprueban reglamento para el control y erradicación de la brucelosis bovina. Pág 190048-190051.

24. **Díaz R, Léviex D.** 1972. Role respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigenes et de immunoglobulines G1 et G2 dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. C.R. Acad. Sci. 274, 1503-1596.
25. **Doherty P, Kaufmann S.** 1994. Inmutnity to infection. Novel insights and new modelsina time of rapad technological change. Curr Opin Immunol; 6: 515- 517.
26. **Duclos S, Desjardins M.** 2000. Subversion of a young phagosome: the survival startegies of intracellular pathogens. Cell. Microbiol. 2:365-377.
27. **Economidou J, Kalafatas P, Valopoulou A.** 1976. Brucellos is in two thalasemia patients infected by blood transfusions from the same donnor. Acta Haematol; 55: 244-249.
28. **Edmonds MD, Schuring GG, Sanmartino LE, Hopt PG, Walter JV, Hazius SD, Elzer PH.** 1999. Biosafety of *Brucella abortus* strain RB51 for vaccination of mature bulls and pregnant heifers. An JVet Res 60:6 722-5.
29. **ENCOLOMBIA.** 2003. Brucelosis. En: ENCOLOMBIA. Disponible: <http://www.encolombia.com/medicina/pediatria/pediatria35400brucelosis.htm>.
30. **Estein S.** 2006. Brucelosis. Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Vol. VII, N° 05. Mayo 2006.
31. **[FAO/OMS] Food and Agriculture Organization/Organización Mundial de la Salud .** 1986. Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Sexto informe. Serie de Informes Técnicos.740. OMS, Ginebra.149p.
32. **Fernández, A.** 1982. Algunos aspectos epizootiológicos de la Brucelosis Bovina en las condiciones de la República de Cuba. Tesis para optar por el grado de candidato a doctor en ciencias veterinarias. Escuela Superior de Veterinaria de Brno. Checoslovaquia. 15-38
33. **Fernandez P, Barrientos C.** 2004. Revista bioanálisis. Publicación disponible en: [http://e-cooprinsem.cl/nueva/with\\_fl/html/images/coopri/brucela.pdf](http://e-cooprinsem.cl/nueva/with_fl/html/images/coopri/brucela.pdf)  
[http://www.revistabioanalisis.com/arxiu/notas/Nota3\\_13.pdf](http://www.revistabioanalisis.com/arxiu/notas/Nota3_13.pdf)
34. **Flores R.** 1980. Brucelosis. En: I Simposium Nacional sobre Enfermedades de los bovinos. Memorias. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovino. 123-126.
35. **Ficht T.** 2003. Intracellular survival of Brucella: defining the link with persistence. Vet Microbiol 92, 213-223

36. **Ficht, TA, Bearden SW, Sowa BA, Marquis H.** 1990. Genetic variation at the omp2 porin locus of the Brucellae species-specific markers. Mol. Microbiol., 4: 1135-1142.
37. **Fiori P, Mastrandrea S, Rappelli P, Cappuccinelli P.** 2000. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. J Clin Microbiol 38, 2005-2006.
38. **Franz Dr, Jahrling Pb, Friedlander Am, McClain Dj, Hoover Dl, Russel W.** 1997. Clinical recognition and management of patients exposed to biological war fare agents. JAMA,; 278(5): 399 -4 11.
39. **Gándara B, López A, Rigel M, Martínez-Romero E.** 2001. Limited genetic diversity of *Brucella spp.* J Clin Microbiol 39, 235-240.
40. **García C, Díaz A, Hernández M.** 1988. Brucelosis. En: Microbiología Especial Veterinaria. Departamento de microbiología Facultad de Medicina Veterinaria. Dpto. de Ediciones del ISAAC, La Habana. 239-245
41. **Gómez-Miguel MJ, Moriyón I, López J.** 1987. Brucella outer membrana lipoprotein shares antigenic determinants with *Escherichia coli* Braun lipoprotein and its exposed on the cell surface. Infect Immun. 55, 258-262.
42. **Guzmán-Berri C, Chaves-Olarte E, Eichel-Streibe C, López-Goñi I, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel J, Moreno E.** 2001. GTPases of the Rho subfamily are sequired for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes. J Biol Chem 276: 44435-44443.
43. **Harmon BG, Adams LG, Frey M.** 1989. Survival of rouge and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. Am. J. Veet. Res; 49:1092-1097.
44. **Hausler W, Koontz F.** 1974. Manual of Clinical Microbiology. 2nd ed. E. Lennette, E. Spaulding, J. Truant eds.. American Society of Microbiology. Washington, D. C. Pgs. 295-301.
45. **Hong P, Tsolis R, Ficht T.** 2000. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. Infect Immun 68, 4102-4107.
46. **Huanuco Agrario .** 2008. Portal Agrario Regional Huánuco. Disponible en: [http://www.huanucoagrario.gob.pe/documentos/pecuario/items/BENEF\\_GANA\\_DO\\_NOVIEMBRE\\_07.xls](http://www.huanucoagrario.gob.pe/documentos/pecuario/items/BENEF_GANA_DO_NOVIEMBRE_07.xls)
47. **Ilarmon B, Adams L, Frey M.** 1988. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. Am J Vet Res 49, 1092-1097.

48. **Informe Anual del Proyecto de Cooperación Técnica PER/5/023 de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA/FAO).** 1999. p 15-18.
49. **Jawetz E, Melnick J, Adelberg I.** 1999. Microbiología Médica. Manual Moderno S.A. México D.F. Pag. 306-309.
50. **Kaufmann S.** 1995. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today*; 16: 338-342.
51. **Kaufmann S.** 1999. Immunity to intracellular bacteria. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 1335-1370.
52. **Kennedy P.C. y Miller R.B.** 1993. The female genital system. In: *pathology of domestic animals*, ed. Jubb K.V.F.; N. Palmer. 4th ed., pp.396-402. Academia Press, San Diego, CA.
53. **Kirkbride C.** 1990. Laboratory diagnosis of livestock abortion. 3ª Ed. Iowa State University Press/AMES. USA. Pag. 22-26.
54. **Ko J, Splitter G.** 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16, 65-78.
55. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática.** 2007. Producción pecuaria. Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/web/aplicaciones/siemweb/index.asp?id=003>
56. **Liautard JP, Gross A, Dornand J, Kohler S.** 1996. Interactions between professional phagocytes and *Brucella spp.* *Microbiol SEM* 12; 197-206
57. **Lopetegui P.** 2005. Avances de la erradicación de la brucelosis bovina en Chile. *Boletín Veterinario Oficial, BVO N° 3*. Servicio Agrícola y Ganadero, Santiago, Chile, Pp 1-14.
58. **Lopez y Contreras.** 2007. *Brucella*. Instituto politécnico Nacional. Disponible en: [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_10/Capitulo10.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_10/Capitulo10.pdf)
59. **Luna A, Rodríguez De Cepeda A, Suárez T.** 1998. Análisis de un brote epidémico de brucelosis en trabajadores de un matadero. *Rev Esp Salud Pública*; 72 :137-146.

60. **Mandell G, Bennet J, Dolin R.** 1995. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. Vol 2., Pp. 2053-2057. Churchill Livingstone. Philadelphia, USA.
61. **Martín-ME, Nogales MC, Flórez C, Gómez MJ, Lozano F, Sánchez A.** 1994. Outbreak of *Brucella mellitensis* among microbiology laboratory workers. J Clin Micro - biol; 32: 2.035-2.0 36.
62. **McMahon K J.** 1983. Comparison of the 2-Mercaptoethanol and (dithio-threitol) tests for determing *Brucella* inmunoglobulin G agglutinating antibody in bovine serun. Can. J. Comp. Med. 47(3): 370-372.
63. **Meador V, Deyoe B.** 1989. Intracellular Localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. Vet Pathol 26, 513-515.
64. **Mederos D, Rodríguez J, Rivero M.**1981. Brucelosis. En: Patología Especial de los Animales Domésticos. Editorial Pueblo y Educación. Primera reimpresión. 206-231.
65. **[MINAG] Ministerio de Agricultura.** 2000. Dirección General de Sanidad Animal SENASA. Decreto Supremo N° 033-2000-AG. Reglamento para el control y erradicación de la brucelosis bovina. Diario Oficial “El Peruano”, publicado el lunes 10 de julio de 2000.
66. **Montes JE, Rodriguez MA, Martín T, Martín F.** 1986. Laboratory acquired meningitis caused by *Brucella abortus* strain 19. J Infect Dis; 154: 915-916 .
67. **Moreno E, Jones LM, Berman DT.** 1984. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. Infect Immun. 43, 779-82.
68. **Moreno R, Rentería E, Searcy B.** 2002. Seroprevalencia y factores de riesgos asociados a la Brucelosis Bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. Rev Téc Pec Méx. 40(3):243-249.
69. **Moriyón I, Díaz R, López-Goñi I.** 2001. Bacteriología del Género *Brucella*. Manual de Brucelosis. Junta de Castilla y León. España. Pág. 21-23.
70. **Moriyón I, Díaz R, López I.** 2002. Bacteriología del género *Brucella*. Manual de Brucelosis. Junta de Castilla y León. España. Pag. 22-30.
71. **Naparstek E, Block Cs, Slavin S.** 1982. Transmission o f brucel losis by bone marrow transplantation . Lancet; 1: 574-575.
72. **Nielsen K.** 2002. Diagnostic of brucellosis by serology. Vet. Microbiol. 90:447-459.

73. [NWF] **National Wildlife Federation.** 2001. Brucellosis. The Real Story. In: Buffalo. National Wildlife Federation. Available: <http://www.nwf.org/buffalo/brucel.html>.
74. [OIE] **Office international des épizooties.** 2004. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Bovine brucellosis. 5th edition. Chapter 2.3.1.
75. **Olle GJ, Canela SJ.** 1987. An outbreak of *Brucella mellitensis* infection by airborne transmission among laboratory workers. Am J Public Health; 77:335-338.
76. **Orduña A, López L, Miguel MA, Gutierrez P, Fernandez M, Rodríguez A.** 2002. Bacteriología del género Brucella. Manual de Brucelosis. Edit. Junta de Castilla y León. España. Pag. 99 – 112.
77. **Palacios F, Lahoz B.** 1998. Brucellosis en una zona de baja incidencia. Atención Primaria; 17(5)
78. **Palmer MV, Cheville NF, Olsen SC.** 1997. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RBS1 vaccination in pregnant Cattle. Am. J. Vet. Res. 58: 472-477.
79. **Pearson A.** 1996. Scavenger receptors in innate immunity. Curr Opin immunol; 8:36-40.
80. **Pedrique M, De Castro N.** 2003. Reacciones antígeno-anticuerpo. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. Cap. 10: 10p
81. **Peña G, Gutierrez A.** 1993. Brucellosis. Enferm Infecc Microbiol Clin; 11(8): 403- 409.
82. **Pérez J, Quesada M, López J. Casquero O, Sierra MA, Martín de las Mulas J.** 1998. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. J Vet Diagn Invest. 10:1 17-21.
83. **Plommet M.** 1987. Brucellosis and immunity: humoral and cellular components in mice. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138, 105-109.
84. **Poole P, Whitehouse D.** 1972. A case of abortion consequent upon infection with *Brucella abortus* biotype 2. J Clin Pathol; 25: 882-884.



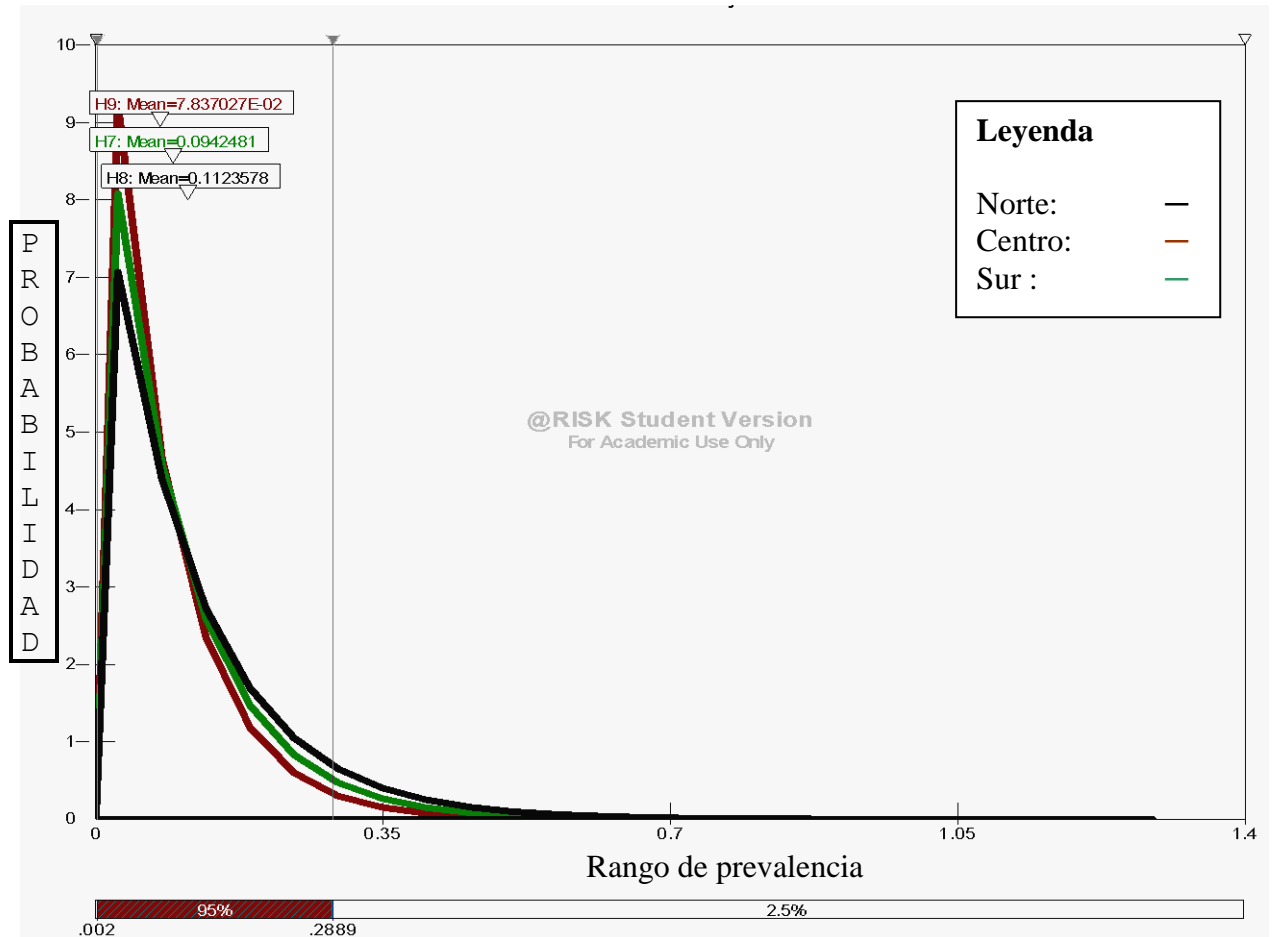
85. **Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K.** 2001. Medicina Veterinaria - Tratado de Enfermedades del Ganado bovino ovino, porcino, caprino y equino. Tomo I. Pag. 1025-1053. McGraw-Hill Interamericana. España.
86. **Rivera S, Ramírez M, Lopetegui I.** 2002. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. Vet Microbiol 90, 45-53.
87. **Robinson A, Melling J.** 1993. Envelope structure and the development of new vaccines. J. Appl. Bacteriol. 74, 43S-51S.
88. **Rodríguez A, Orduña A, Ariza X, Moriyon I, Díaz R, Blasco J, Almaraz A, Martínez F, Ruiz C, Abad R.** 2001. Manual de Brucelosis. Ed. Junta de Castilla y León. Copyright. Zamora, España. 139pp.
89. **Rodríguez Z M, Solera SJ, Sanchez ML, Alvarez-Mon M.** 1998. Brucelosis . Aspectos patogénicos. Clínica, diagnóstico y tratamiento. Formas específicas de la enfermedad. Medicine ; 79: 15-24.
90. **Roop R, Fletcher T, Sriranganathan N, Boyle S, Schurig G.** 1994. Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. Infect Immun 62, 1000-1007.
91. **Rubben B, Band J, Wong P, Colvillej.** 1991. Person to person transmission of *Brucella mellitensis*. Lancet; 337: (8732) 14-15.
92. **Sadler WW.** 1960. Present evidence on the role of meat in the epidemiology of human brucellosis. A m J Public Health; 5 0: 54 0-4.
93. **Samartino LE, Fort M, Groyoret R, Schuring GG.** 2000. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. Prev Vet Med. 45: 193-199.
94. **Samartino, L.** 2003. Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Jornada de actualizaciones sobre brucelosis bovina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. Pag. 1-7.
95. **Sangari FJ, García-lobo JM, Agüero J.** 1994. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. FEMS Microbiol. Lett.121: 337-342
96. **Sauret J, Vilissova N.** 2002. Human Brucellosis. J. Am Board Fam Pract 15, 401-406.
97. **Sbriglio L, Sbriglio H, Sainz S.** 2007. Brucelosis. Una patología generalmente subdiagnosticada en Humanos y que impacta negativamente en la producción

- pecuaria y desarrollo de nuestros países. Revista Bioanálisis. Enero-Febrero 2007:19-22.
98. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria.** 2002. *Brucella abortus*. En: SENASA. Disponible: [http:// www. senasa.gob.pe/Sanidad-Animal/Programas-Zoosanitarios/ Brucelosis bovina.htm](http://www.senasa.gob.pe/Sanidad-Animal/Programas-Zoosanitarios/Brucelosis%20bovina.htm).
  99. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria.** 2006. Programa de control y erradicación de tuberculosis y brucelosis bovina. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe>
  100. **Schreyer P, Caspi E, Leiba Y.** 1980. Brucella septicemia in pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol; 10: 99-107.
  101. **Singer R, Amitai Y, Geist M, Shimonovitz S, Herzog N, Reis A.** 1991. Neonatal brucellosis possible during delivery. Lancet; 33 8: 12 7-1 28.
  102. **Syrjamaki C, Migliazzo A, Yarborough Jw.** 1984. Brucella abortus endocarditis following ingestion of cow's blood. Nebr Med J.; 6 9: 14 1-3.
  103. **Talamante S, Calderón C, Cortés C, Calatayu Da.** 1991. Estudio epidemiológico de la brucelosis en la provincia de Valencia (1943 -1989). R ev San Hig Pub; 3: 259-267.
  104. **Tizard, I.** 1998. Inmunología Veterinaria. Serología: detección de anticuerpos y métodos de medición. 5ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pag. 233 – 253.
  105. **Unanue ER.** 1993. Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. In: Paul WE, Editor. Fundamental Immunology . 3era ed. New York: Raven Press: 111-144.
  106. **Vazquez J, González De Quevedo M, Pardo J, Iranzo A, Sureda Md, Andrés MD.** 1994. Brucelosis en la provincia de Almería: estudio retrospectivo en el período 1988 -1990. Aten Primaria; 1: 3 1-3 4. 108-109.
  107. **Wilson, G. Miles A.** 1975. Brucelosis. En: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 5ta ed. Vol. I. Cap. 3. Edición Revolucionaria. Instituto Cubano del Libro. 266- 280.
  108. **Yagupsky P.** 1999. Detection of Brucellae in blood cultures. J Clin Microbiol 37, 3437-3442.
  109. **Young EJ.** 1995. Brucellosis: current epidemiology, diagnosis and management. Curr Clin Top Infect Dis; 15: 115- 128.

110. **Young EJ.** 1994. *Brucella* species. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone: 2053-2060.
111. **Zapata, F.** 1998. Seroprevalencia de *Brucella abortus* en el Centro poblado menor de Obenteni-Gran Pajonal mediante la prueba de ELISA. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima. 39 p

## IX. ANEXO I

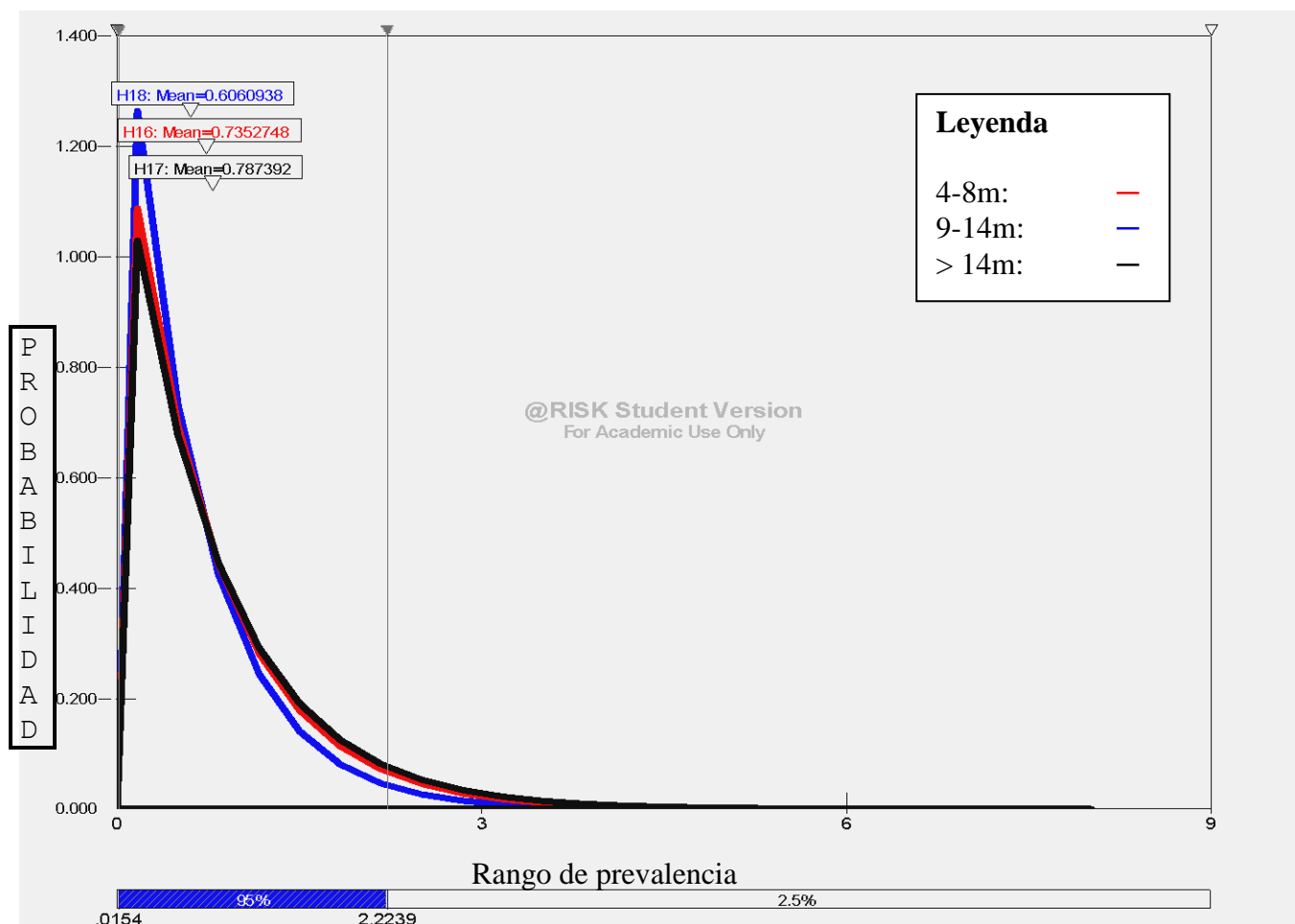
**Gráfico 2.** Distribución beta de las prevalencias para cada zona, con intervalo del 95% de confianza (Puerto Inca, Huánuco)



**Cuadro 4.** Rango de probabilidades donde se distribuye las prevalencias para cada zona al 95% de confianza (Puerto Inca, Huánuco).

Zonas	Prevalencia Media (%)	Minimo (%)	Máximo (%)
Norte	0.11	0.003	0.41
Centro	0.09	0.002	0.35
Sur	0.08	0.002	0.29

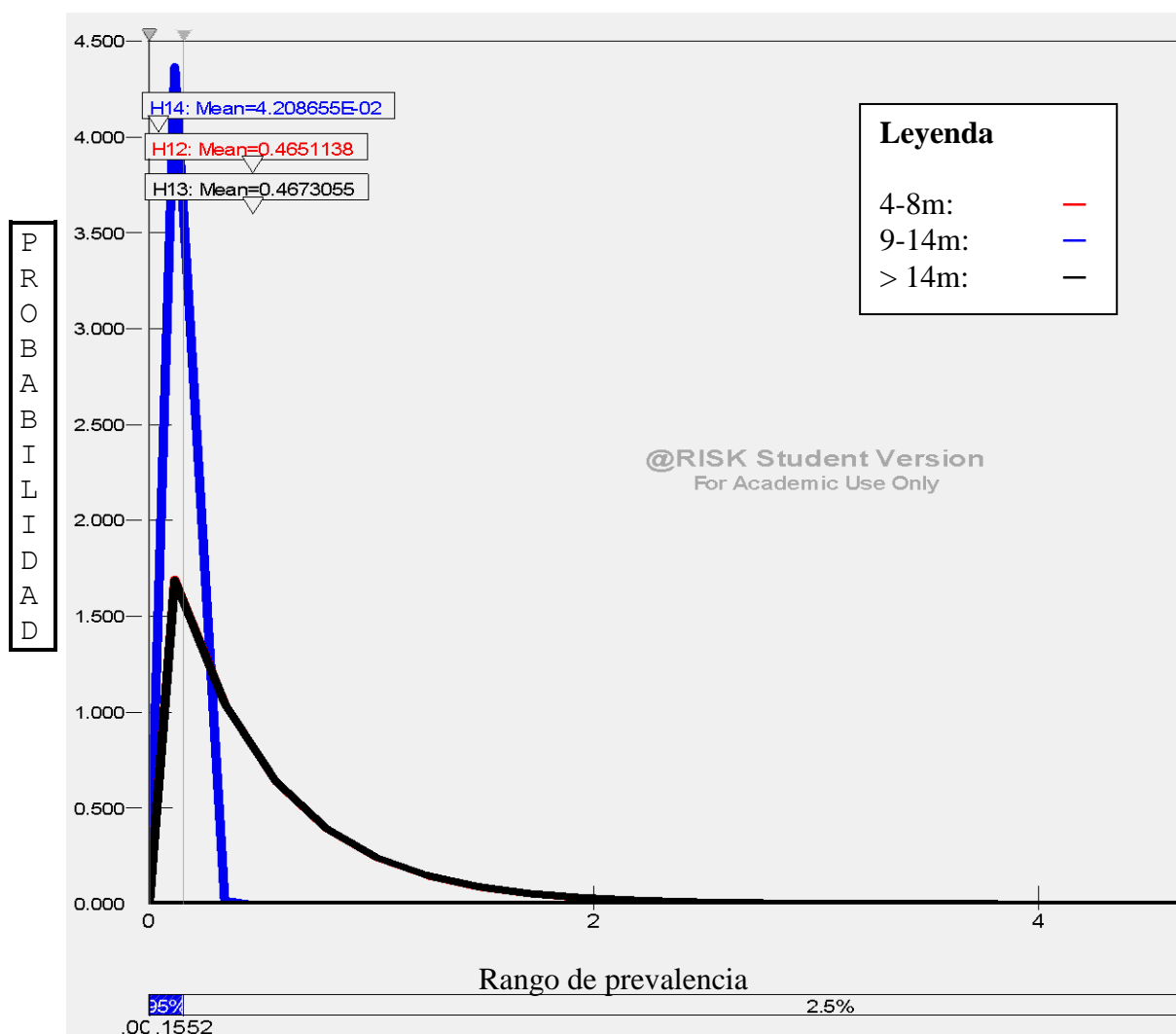
**Gráfico 3.** Distribución beta de las prevalencias para cada grupo etáreo macho, con intervalo del 95% de confianza (Puerto Inca, Huánuco)



**Cuadro 5.** Rango de probabilidades donde se distribuye las prevalencias por grupo etáreo macho al 95% de confianza (Puerto Inca, Huánuco).

Grupo Etáreo Macho	Prevalencia Media (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
4-8 meses	0.74	0.02	2.70
9-14 meses	0.79	0.02	2.88
May. 14 meses	0.61	0.02	2.22

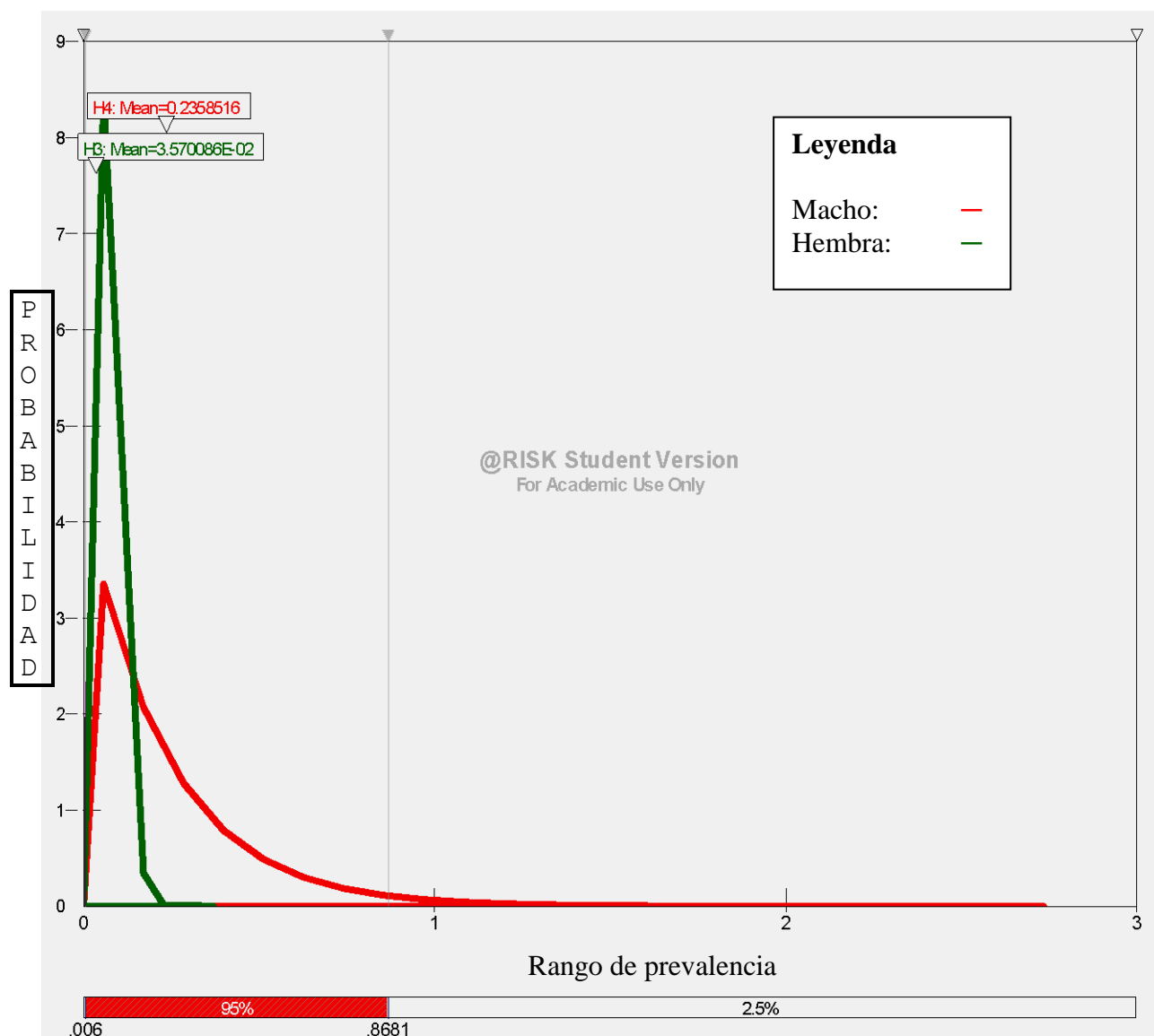
**Gráfico 4.** Distribución beta de las prevalencias para cada grupo etáreo hembra, con intervalo del 95% de confianza (Puerto Inca, Huánuco)



**Cuadro 6.** Rango de probabilidades donde se distribuye las prevalencias por grupo etáreo hembra al 95% de confianza (Puerto Inca, Huánuco).

Grupo Etáreo Hembra	Prevalencia Media (%)	Minimo (%)	Máximo (%)
4-8 meses	0.74	0.012	1.71
9-14 meses	0.47	0.012	1.72
May. 14 meses	0.042	0.001	0.16

**Gráfico 5.** Distribución beta de las prevalencias para cada sexo, con intervalo del 95% de confianza (Puerto Inca, Huánuco)



**Cuadro 7.** Rango de probabilidades donde se distribuye las prevalencias según el sexo de los animales al 95% de confianza (Puerto Inca, Huánuco).

Sexo	Prevalencia Media (%)	Minimo (%)	Máximo (%)
Macho	0.24	0.006	0.87
Hembra	0.36	0.009	0.13

## X. ANEXO II

Mapa de la Provincia de Puerto Inca

